



Уральский
федеральный
университет

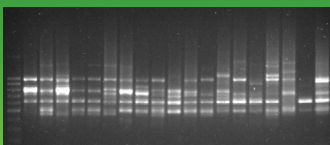
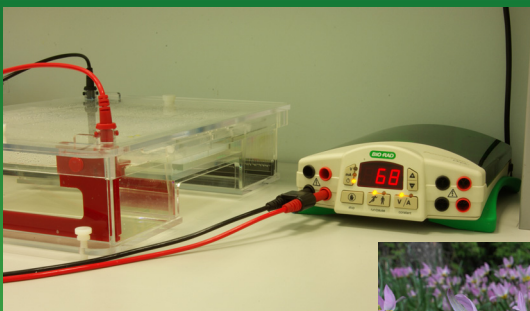
имени первого Президента
России Б.Н.Ельцина

Институт естественных наук
и математики

Н. А. КУТЛУНИНА
А. А. ЕРМОШИН

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б. Н. ЕЛЫЦИНА

Н. А. Кутлунина, А. А. Ермошин

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано методическим советом УрФУ
для студентов, обучающихся по программам бакалавриата
по направлениям подготовки
06.03.01 «Биология», 05.03.06 «Экология и природопользование»

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2017

ББК 575.088(07)
К95

Р е ц е н з е н т ы:

лаборатория филогенетики и биохронологии
Института экологии растений и животных УрО РАН
(заведующий лабораторией доктор биологических наук А. В. Бородин);

А. Х. Баймиев, доктор биологических наук,
заведующий лабораторией молекулярной биологии
и нанобиотехнологии;

Б. Р. Кулуев, доктор биологических наук, старший научный сотрудник
(Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН)

Кутлунина, Н. А.

К95

Молекулярно-генетические методы в исследовании растений : учеб.-метод. пособие / Н. А. Кутлунина, А. А. Ермошин ; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2017. – 142 с.
ISBN 978-5-7996-2142-1

В учебно-методическом пособии рассмотрены современные подходы к молекулярно-генетическим исследованиям растений. Подробно показаны методы анализа изоферментов и нуклеиновых кислот. В пособие включены лабораторные работы для больших и малых спецпрактикумов.

Рекомендуется студентам для самостоятельной работы и выполнения лабораторных работ при изучении дисциплин «Физические методы в биологии», «Филогения и филогеография» и др.

ББК 575.088(07)

На обложке:

камера для горизонтального электрофореза и источник тока фирмы Bio-Rad;
электрофореграмма ПЦР-продуктов в агарозном геле

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	6
1. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ	8
1.1. Принцип метода электрофореза белков. Электрофоретическая подвижность	8
1.2. Классификация электрофоретических методов	11
1.3. Особенности электрофореза в полиакриламидном геле	14
1.4. Нативный и SDS-ПААГ-электрофорез	16
1.5. Диск-электрофорез	17
1.6. Аллозимный анализ	17
<i>Лабораторная работа 1</i> Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях	22
<i>Лабораторная работа 2</i> Проявление электрофореграмм с помощью красителя кумасси	25
<i>Лабораторная работа 3</i> Определение молекулярной массы белка в геле	26
<i>Лабораторная работа 4</i> Нативный электрофорез. Выявление изоферментных спектров пероксидазы	27
<i>Лабораторная работа 5</i> Выявление изоферментных спектров супероксиддисмутазы	29
<i>Лабораторная работа 6</i> Изоферментный анализ генетического полиморфизма в популяции растений	30
2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК	35
2.1. Растительный материал для выделения ДНК	35
2.2. Особенности выделения ДНК из растительных объектов	35
<i>Лабораторная работа 7</i> Метод солевой экстракции ДНК с фенольной депротеинизацией	40
<i>Лабораторная работа 8</i> Выделение суммарной ДНК из растений по Devey et al. с небольшими модификациями	42

<i>Лабораторная работа 9</i>	
Выделение геномной ДНК (с мочевиной)	43
<i>Лабораторная работа 10</i>	
Быстрый метод выделения ДНК из растительных тканей	45
<i>Лабораторная работа 11</i>	
Выделение ДНК растений с использованием СТАВ	46
<i>Лабораторная работа 12</i>	
Дополнительная очистка ДНК	48
3. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ПРЕПАРАТОВ ДНК И РНК	50
<i>Лабораторная работа 13</i>	
Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК	51
<i>Лабораторная работа 14</i>	
Определение концентрации нуклеиновых кислот микрометодом	53
4. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ	56
4.1. Суть метода ПЦР	56
4.2. Модификации метода ПЦР	69
4.3. Преимущества ПЦР перед другими методами	77
4.4. Практическое применение и перспективы развития метода ПЦР	78
<i>Лабораторная работа 15</i>	
Проведение ПЦР-амплификации ДНК с ISSR-праймерами	79
<i>Лабораторная работа 16</i>	
Проведение ПЦР-амплификации ДНК с ITS-праймерами	81
<i>Лабораторная работа 17</i>	
Определение наличия ГМО в продуктах питания	82
5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	84
<i>Лабораторная работа 18</i>	
Электрофорез в 6 % полиакриламидном денатурирующем геле и процедура окраски полиакриламидных гелей нитратом серебра	88
<i>Лабораторная работа 19</i>	
Электрофорез в 1 % агарозном геле и ТАЕ-буфере	90
<i>Лабораторная работа 20</i>	
Выделение ДНК из агарозного геля и ее очистка	91
6. СЕКВЕНИРОВАНИЕ	94
6.1. Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту:	
метод химической дегградации	94

6.2. Секвенирование ДНК по Сэнгеру: «плюс-минус» метод	96
6.3. Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод «терминаторов»	97
6.4. Автоматическое секвенирование ДНК	101
6.5. Методы секвенирования нового поколения	101
<i>Лабораторная работа 21</i>	
Подготовка образцов к секвенсированию реакции.	
Метод прямого пересадки ДНК в мягких условиях	105
7. МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДНК. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ	108
7.1. Особенности растительного генома	108
7.2. Молекулярные маркеры	109
7.3. RAPD-анализ	113
7.4. ISSR-маркирование	114
7.5. SSR-маркеры	116
7.6. AFLP-метод	118
7.7. SNP	120
Список библиографических ссылок	122
Глоссарий	126
Учебное оборудование	138

ПРЕДИСЛОВИЕ

Биология – самая быстро развивающаяся наука второй половины XX и XXI в. Крупные открытия в биологии (выявление структуры ДНК, полимеразная цепная реакция, создание ДНК-чипов, секвенирование), а также значительно возросшие технические возможности позволили сформироваться науке молекулярной биологии и целой группе методов, известных как молекулярные или молекулярно-генетические методы. В настоящее время эти методы активно применяются не только в биологии, но и в других областях: медицине, криминалистике, археологии.

Современную биологию невозможно представить без молекулярно-генетических методов. Первыми были методы, основанные на полиморфизме белков. Изоферментный анализ позволяет выявлять уровень полиморфизма популяций, их генетическую структуру, определять уровень генетической закрытости или, наоборот, открытости популяций и многое другое. В настоящее время эти методы продолжают использоваться, но большинство исследователей и лабораторий переходят на анализ полиморфизма нуклеиновых кислот. Отчасти это связано с тем, что белки можно выделять только из живого материала или из замороженного при температуре -70 – -80 °C, тогда как ДНК можно выделять и из живого, и из высушенного материала. Кроме того, методы ДНК-анализа позволяют изучать как ядерный, так и пластидный и митохондриальный геномы. В связи с этим молекулярно-генетические методы, основанные на полимеразной цепной реакции и секвенировании ДНК, активно используются в таких областях исследования растений, как:

- генетический полиморфизм природных популяций;
- анализ чистоты сортов;
- выявление гибридов;
- выявление филогенетических связей видов, родов и таксонов более высокого уровня;
- анализ транскрипционной активности генов.

При изучении обязательных курсов на биологическом факультете студенты знакомятся с современными методами анализа, в том числе молекулярно-генетическими. Выпускники, владеющие этими методами, востребованы в лабораториях и исследовательских центрах города, области и региона. В последние годы опубликовано большое количество монографий и пособий, охватывающих широкий круг вопросов молекулярной биологии. В то же время каждый научный центр имеет свою специфику, пользуется своими наработками и методиками. Поэтому цель данного учебно-методического пособия – систематизировать методики, которые используются при исследовании растений. Важной особенностью пособия является наличие теоретических разделов, которые способствуют пониманию практического материала и служат опорой при самостоятельной работе студентов.

При написании пособия использовались монография В. Е. Падутова с соавт. (2007), статьи Е. К. Хлесткиной (2011, 2013) и Н. А. Рябушкиной с соавт. (2012), а также учебно-методические пособия И. В. Стручковой и Е. А. Кольясовой (2012), В. А. Великова (2013), «Основы полимеразной цепной реакции» (2012) и др.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов-бакалавров и магистрантов, изучающих молекулярно-генетические курсы и выполняющих квалификационные работы по соответствующей тематике, а также для аспирантов и научных сотрудников.

1. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

Метод электрофореза, предложенный еще в начале XX в., сейчас широко используют в биологии и медицине для разделения белков в исследовательских и клинических целях. С помощью электрофореза можно разделить на отдельные компоненты белковую смесь, что позволяет установить молекулярную массу белка или его субъединиц, подтвердить чистоту выделенного белка.

Электрофорезом называют движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля.

Электрофоретический метод в биохимии – это способ пространственного разделения молекул, имеющих разный заряд и размеры, путем помещения их в электрическое поле.

Результатом проведения электрофореза является *электрофореграмма* – картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления. Электрофореграммы белков-ферментов (зимограммы) позволяют изучать изменения активности и изоферментного спектра белков под действием внешних и внутренних факторов как у растений, так и у других организмов.

1.1. Принцип метода электрофореза белков.

Электрофоретическая подвижность

В растворе белки находятся в виде заряженных частиц. Заряд на поверхности белков возникает в результате диссоциации группировок, находящихся в боковых радикалах аминокислот (карбоксильных, амино-, имидазольных и других групп), а также при связывании ионов. Так как степень диссоциации группировок зависит от pH раствора, то величина и знак суммарного заряда белковой молекулы зависят от pH среды, а также от ионной силы (интенсивности электрического поля, создаваемого ионами в растворе).

Для расчета ионной силы следует найти произведение концентрации каждого иона на квадрат его заряда, сложить все полученные величины и итоговую сумму разделить пополам. Если в растворе присутствуют два или более электролитов, то вычисляется общая суммарная ионная сила раствора. Для каждого белка существует такое значение pH среды (обозначаемое как pI – изоэлектрическая точка), при котором положительные и отрицательные заряды ионизированных групп скомпенсированы, поэтому заряд всей белковой молекулы равен нулю. В буфере с pH , равным pI изучаемого белка, отсутствие заряда на белковой молекуле делает невозможным ее движение в электрическом поле. Из-за разницы в аминокислотном составе разные белки имеют разные значения pI . При $pH \neq pI$ молекулы белка приобретают заряд и под действием электрического поля перемещаются к противоположно заряженному электроду – катоду (–) или аноду (+). Например, кислые белки, богатые моноаминодикарбоновыми аминокислотами (*асп*, *глу*), в слабощелочном буфере приобретут отрицательный суммарный заряд из-за диссоциации $COOH$ -групп до COO^- и H^+ и будут двигаться к аноду.

Для электрофоретического разделения оптимально такое значение pH рабочего буфера, которое обуславливает максимальное различие зарядов разных белков, составляющих исходную смесь, а не их максимальный заряд. Обычно электрофорез проводят в среде (буфере) со значением pH , на 3–4 единицы отличающимся от среднего значения pI для белков данного типа. Это позволяет добиться хорошей электрофоретической подвижности и вместе с тем сохранить ощутимые различия молекул по заряду. Предпочтительно использовать буфер известной и постоянной ионной силы на основе однозарядных ионов. От рабочего буфера также требуется существенная емкость, так как локальная концентрация белка в образующихся при разделении смеси зонах скопления молекул может оказаться значительной. Поэтому используют буферы с концентрацией не менее 0,1–0,2 M .

При проведении электрофореза электрическое поле создают с помощью источника питания – стабилизированного выпрямителя, способного давать регулируемое напряжение до 500–1000 В

при силе тока в несколько десятков миллиампер (мА). Напряжение на участке электрической цепи равно разности потенциалов на концах этого участка, если на этом участке нет источника сторонних сил, разделяющих разноименные заряды. При электрофорезе участок электрической цепи – это буфер. Электрофорез проводят в однородном электрическом поле, т. е. поле, напряженность (E) которого во всех точках одинакова. Электрический ток пропускают через проводник – буферный раствор, налитый в канал из изолирующего материала (например, стекла) или пропитывающий какую-либо поддерживающую среду-носитель (например, бумагу или гель). Сопротивление (R) буферного раствора задается двумя факторами: концентрацией в нем свободных ионов и их электрофоретической подвижностью. Электрофоретической подвижностью (u) данной молекулы называют скорость движения заряженной молекулы (см/ч) в электрическом поле с напряженностью 1 В/см. Единицей электрофоретической подвижности является $\text{см}^2/\text{ч} \cdot \text{В}$.

Именно различия в электрофоретической подвижности белков, содержащихся в анализируемой смеси, позволяют разделить эти белки в пространстве (в разных зонах электрофореграммы). Скорость (V) движения белков к тому или иному электроду снижается из-за их трения об окружающую среду. Сила трения (или, иначе, сила сопротивления окружающей среды) прямо пропорциональна скорости движения белковых молекул. Коэффициент трения белковой молекулы, обозначенный как f , зависит от размера, формы, степени гидратированности этой молекулы и от свойств самой среды. При электрофорезе работа силы трения заряженных компонентов разделяемой смеси о среду приводит к нагреву геля. Кроме того, образование тепла вызывается прохождением электрического тока. В итоге происходит значительное возрастание температуры, которое ухудшает результаты электрофоретического разделения, так как изменяет вязкость и проводимость среды, увеличивает скорость диффузии молекул, способствует испарению летучих компонентов, приводит к денатурации белков. Поэтому при проведении электрофореза следует обеспечить охлаждение системы.

Электрофоретическая подвижность белка зависит:

- от самой молекулы: ее размера (молекулярной массы);
- формы, электрического заряда, степени диссоциации и гидратации;
- концентрации молекул;
- среды: ее вязкости, pH, температуры и ионной силы;
- характеристик используемого электрического поля.

1.2. Классификация электрофоретических методов

Основными типами электрофореза являются:

- зональный электрофорез;
- изоэлектрическое фокусирование;
- иммуноэлектрофорез.

Зональный электрофорез ведется при постоянном (неизменяющемся) значении pH буферного раствора, заполняющего данный носитель (бумагу, гель, др.). Исследуемый образец наносится пятном или тонким слоем на носитель, по которому и перемещается в электрическом поле.

Усложненным вариантом зонального электрофореза является **диск-электрофорез** (многофазный зональный электрофорез), при котором pH и другие характеристики, постоянные внутри одной «фазы», при переходе к другой «фазе» скачкообразно изменяются.

При **изоэлектрическом фокусировании** в среде для электрофореза создается плавный градиент pH. Белок останавливается в зоне, где значение pH равно его изоэлектрической точке (pI). Для создания градиента pH обычно используют раствор полиамино-поликарбоновых кислот, которым насыщают носитель. В отсутствии электрического поля эта смесь обычно имеет pH = 6,5. При наложении электрического поля указанные кислоты обеспечивают линейный градиент pH от 3 до 10.

Иммуноэлектрофорез сочетает в себе электрофоретическое разделение белков с иммунопреципитацией, основанной на реакции «антиген – антитело». Этот тип электрофореза превосходит остальные по чувствительности и разрешающей способности.

По цели различают:

- *аналитический* электрофорез (для анализа состава смеси);
- *препаративный* электрофорез (для получения препаратов – значительных количеств чистых веществ).

По степени денатурации разделяемых белков различают:

- *нативный* электрофорез;
- *электрофорез в денатурирующих условиях.*

В отличие от нативного электрофореза, электрофорез в денатурирующих условиях предполагает применение химических реагентов, разрушающих пространственную структуру разделяемых белков.

По направлению фракционирования выделяют электрофорез, при котором белки движутся в *одном* направлении, и *двумерный* электрофорез, при котором сначала происходит разделение в *одном* направлении, а затем – в направлении, перпендикулярном первому. Двумерный электрофорез позволяет резко увеличить разрешающую способность при разделении смесей, состоящих из большого количества разных белков.

В зависимости от ориентации носителя (геля, бумаги, др.) электрофорез может быть *вертикальным* или *горизонтальным*.

Классификация по типу носителя жидкой фазы представлена в таблице. Первым был разработан электрофорез без какого-либо носителя: электрическая цепь между электродами замыкалась через буферный раствор, в котором и происходило разделение белков. Позднее при электрофорезе начали применять носители жидкой фазы – полимеры, служащие «каркасом» для буфера. Применение носителей позволило заметно снизить конвекцию (перемешивание) и, следовательно, повысить качество разделения белков. Носитель может быть в форме порошка, пленки, геля и др. Последующие разработки были посвящены усовершенствованию свойств носителей.

Идеальный носитель должен:

- а) резко снижать конвекцию;
- б) быть простым в приготовлении;
- в) иметь высокую теплопроводность (при низкой теплопроводности трудно охлаждать систему);

Преимущества и недостатки использования различных носителей при электрофорезе

Носитель	Преимущества	Недостатки
Крахмальный гель (предложен О. Смитисом)	Первый носитель со свойствами молекулярного сита. Активно препятствует конвекции. Повышает разрешение	Низкая прозрачность, хрупкость, размер пор можно менять лишь в небольших пределах. Приготовление качественного геля – трудоемкий процесс
Агарозный гель	Удовлетворительная прозрачность, высокая пластичность (проще резать, удобнее красить и определять ферментативную активность прямо в геле), простота изготовления	Из-за отрицательного заряда на сульфатных и COOH-группах сетки агара возникает электроосмос, приводящий к неравномерному распределению электрического поля, а иногда – гидростатического давления
Полиакриламидный гель – ПААГ (предложен Л. Орнстейном и Д. Дэвисом)	Химически инертен, можно кипятить. Можно задать необходимый размер пор и обеспечить свойства молекулярного сита. Высокая прозрачность. Легко готовить. Упругий, прочный	На сегодняшний день наилучший носитель, но готовится из акриламида – ядовитого вещества

г) обладать низкой адсорбционной емкостью и химической инертностью в отношении веществ, подвергаемых электрофорезу;

д) не иметь заряда на поверхности частиц, чтобы не вызывать эндоэлектроосмос. Если разделяемые белки заряжены отрицательно, то при электрофорезе они должны двигаться к аноду (+), однако эндоэлектроосмос «тянет» их в другую сторону, к катоду (–), мешая электрофоретическому разделению.

Гели легко принимают разные геометрические формы, поэтому в названии электрофоретического метода с их использованием

указывают, *какова конфигурация рабочего пространства*. Гель для электрофореза можно заполимеризовать:

- в трубках,
- капиллярах,
- пластинах.

Основной недостаток электрофореза в трубках – это отсутствие теплооттока: температура в центре цилиндра геля оказывается выше, чем у его прилегающей к стеклу поверхности. Это приводит к изгибу белковых зон. На одну трубку наносится одна исследуемая проба.

В тонких пластинах также достигается более эффективное отведение тепла. Так, при воздушном охлаждении эффективный теплоотвод возможен при силе тока 50–100 мА на вертикально расположенную пластину. Кроме того, конфигурация пластины позволяет в абсолютно идентичных условиях проводить разделение сразу нескольких (10–13) проб белка. Пластины легко сканировать и удобно разрезать. По сравнению с цилиндрическими гелями гелевые пластины позволяют значительно уменьшить концентрацию белка в наносимой пробе.

1.3. Особенности электрофореза в полиакриламидном геле

Полиакриламидный гель (ПААГ) обладает многими качествами идеального носителя (см. таблицу). Имея свойства молекулярного сита, он обеспечивает электрофоретическое разделение белковых смесей не только по заряду, но и по размеру и форме частиц. При электрофорезе в ПААГ крупные молекулы, размеры которых соизмеримы с диаметром пор геля, движутся медленнее, а мелкие молекулы свободно и быстро проходят через поры геля. ПААГ формируют путем сополимеризации акриламида (создающего линейную «основу») и N, N'-метиленабисакриламида (служащего для поперечных «сшивок» линейных цепей).



Акриламид



N, N'-метиленабисакриламид

Меняя концентрацию акриламида от 2 до 50 %, можно задать определенную пористость геля. Например, диаметр пор в геле, содержащем 7,5 % акриламида, равен 5 нм, а в содержащем 30 % акриламида – 2 нм. При выборе концентрации геля учитывают среднюю молекулярную массу (M_r) разделяемых веществ и форму их молекул.

В результате сополимеризации образуется трехмерная сетка геля. Каждый второй углеродный атом линейной цепи содержит кислотную амидную группу, что обеспечивает гидрофильность полимера. В то же время ПААГ не содержит ионизируемых групп.

Для сополимеризации нужны инициаторы и катализаторы (окислительно-восстановительные системы – источники свободных радикалов). Чаще всего используют систему из двух компонентов, представленных ниже:

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ –
персульфат аммония (ПСА),
синоним – надсерноокислый
аммоний; функция:
инициатор полимеризации

$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
N, N, N', N' –
тетраметилэтилендиамин
(ТЕМЕД); функция:
катализатор образования ПААГ

Механизм действия персульфата: при разрыве связи О–О образуются два свободных радикала, каждый из которых стимулирует разрыв двойной связи в молекуле акриламида и присоединяется к ней, также образуя свободные радикалы. Каждый такой радикал, в свою очередь, вызывает разрыв двойной связи и присоединение следующей молекулы акриламида с образованием нового радикала и т. д. По такому же механизму в растущую цепочку линейного полимера одной из своих концевых винильных групп может встроиться метиленбисакриламид. Если его второй конец встроится в состав другой линейной полимерной цепочки, то образуется «сшивка». Без агента, индуцирующего поперечные сшивки, в геле образуются лишь продольно расположенные длинные тонкие волокна.

1.4. Нативный и SDS-ПААГ-электрофорез

В полиакриламидном геле можно проводить как нативный электрофорез, так и электрофорез в денатурирующих условиях (рис. 1.1). Нативный электрофорез в ПААГ служит для разделения не подвергнутых денатурации белков (т. е. белков в нативном состоянии), в том числе в случаях, когда необходимо сохранить ферментативную или любую другую функциональную активность белков. Электрофоретическая подвижность белка в нативном состоянии зависит одновременно и от его суммарного заряда, и от молекулярной массы, и от пространственной конфигурации полипептидной цепи. Для установления строгой количественной корреляции между одним из этих параметров и электрофоретической подвижностью белка нужно исключить влияние всех остальных.

В случае когда требуется фракционировать белки исключительно по молекулярной массе, применяют ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях. Такая система была разработана У. К. Лэммли. Этот метод позволяет оценить количество полипептидов в белковой смеси, при его использовании достигается очень четкое разделение зон, но активность ферментов полностью или в значительной мере может быть утрачена из-за их денатурации. Денатурирующие условия создаются путем обработки пробы трехкратным избытком додецилсульфата натрия, сокращенно – ДСН. Чаше данное вещество обозначают SDS – от английского «*sodium dodecyl sulfate*». Анион SDS несет отрицательный заряд.

Благодаря гидрофобным взаимодействиям анионы SDS сорбируются на белках пропорционально их объему, превращая любой полипептид в неразветвленный стержень с отрицательным зарядом, значительно превышающим собственный заряд белковой молекулы. Так как в присутствии SDS соотношение «размер/заряд» становится практически одинаковым для любого белка, разделение происходит исключительно по молекулярной массе. Отметим, что для полной денатурации белки, имеющие S–S-связи, до применения SDS обрабатывают β-меркаптоэтанолом, имеющим сильный неприятный запах, поэтому работы проводят под тягой. В ка-

честве альтернативы β-меркаптоэтанола используют дитиотреитол ($C_4H_{10}O_2S_2$), его требуется в 2 раза меньше, он менее летучий и не обладает столь специфическим запахом, однако он гораздо дороже.

1.5. Диск-электрофорез

Диск-электрофорез получил свое название от двух английских слов: *discontinuity* (неоднородный, прерывистый) и *discoïd* (дискообразный). Первое подчеркивает неоднородность электрофоретической среды, применяемой в этом методе. Второе описывает случайный признак – дискообразную форму зон разделенных белков в условиях, выбранных первооткрывателями метода. При диск-электрофорезе создают скачкообразные изменения концентрации (и, следовательно, пористости) геля, pH, градиента напряжения.

Вертикальный диск-электрофорез предполагает использование двух, а иногда и трех наслаиваемых друг на друга гелевых слоев:

1) концентрирующий гель – крупнопористый гель. Размер его пор ограничивает диффузию, но не обеспечивает гелю свойства молекулярного сита по отношению к разделяемым белкам. Этот гель нужен для электрохимического концентрирования белков пробы, т. е. концентрирующий гель собирает смесь белков перед переходом в разделяющий гель в одну узкую полосу;

2) разделяющий (сепарирующий, разрешающий, «running»-гель) – нижний мелкопористый гель, в котором, собственно, и происходит электрофоретическое и молекулярно-ситовое разделение компонентов пробы.

1.6. Аллозимный анализ

Изоферменты, или изозимы, по определению Международной комиссии по биохимической номенклатуре, – это генетически детерминированные множественные молекулярные формы фермента, выявляемые у особей одного и того же вида и обладающие одинаковой субстратной специфичностью, но различающиеся

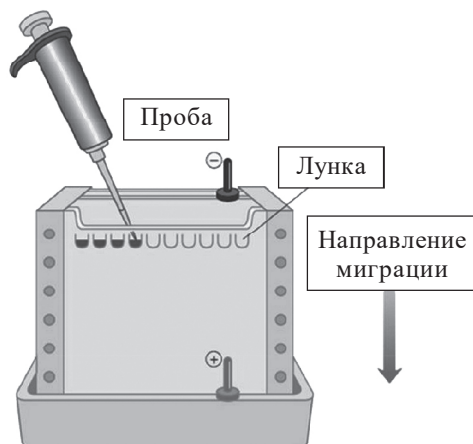


Рис. 1.1. Вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле
[Большой лабораторный практикум по биохимии..., с. 53]

своей первичной структурой и физико-химическими свойствами. Генетически гомологичные изоэлемы, кодируемые аллельными генами одного локуса, предложено называть аллоэлемы.

Использование электрофоретических вариантов белков как маркеров генов основано на соответствии последовательностей нуклеотидов в генах и последовательности аминокислот в полипептидах. Влияние генных мутаций на первичную структуру белка было установлено уже в первых работах в области биохимической генетики популяций. В этих исследованиях было описано аномальное электрофоретическое поведение гемоглобина при серповидноклеточной анемии у человека [Pauling et al., p. 545]. Доказано наследование этой патологии как простого менделирующего признака и обнаружено, что разница между нормальным и аномальным электрофоретическими типами определяется мутационным замещением глутаминовой кислоты валином в положении 6 глобиновой β -цепи. Данные о том, что замены аминокислотных остатков в белках в результате мутаций могут изменять физико-химические свойства белков, в частности, их электрофоретическую подвижность, легли в основу использования электрофоретических методов для выявления биохимической наследственной изменчивости. Принципиальное

значение имело создание высокоразрешающих анализирующих методов электрофореза белков в крахмальном и полиакриламидном гелях.

Электорофоретическое разделение экстрактов белков в геле с последующим гистохимическим окрашиванием с целью их обнаружения является основным методом исследования изоферментов. Впервые метод гель-электрофореза для анализа изоферментов был использован при изучении эстераз [Hunter, Markert, p. 1294]. В дальнейшем метод получил широкое применение в силу ряда достоинств, которые подчеркиваются и в экспериментальных, и в обзорных работах [Левитес; Алтухов]. Метод гистохимического окрашивания позволяет: 1) выявить индивидуальные ферменты на электрофореграмме, полученной от смеси белков; 2) анализировать свежеекстрагированный нативный материал (нет необходимости предварительно фракционировать белки); 3) использовать малое количество материала (несколько миллиграммов ткани), при этом анализировать много проб одновременно и сразу определять их генотипы.

Для проведения электрофоретического анализа изоферментов, или, иначе, аллозимного анализа, образцы тканей гомогенизируют для освобождения из клеток ферментов и других белков, гомогенат помещают в стартовые лунки. После этого через гель пропускают (обычно в течение нескольких часов) постоянный электрический ток, под действием которого белки начинают перемещаться в геле. Скорость и направление их перемещения определяются размерами и суммарным электрическим зарядом соответствующих молекул. После выключения тока гель обрабатывают раствором, содержащим субстрат, специфически взаимодействующий с исследуемым ферментом, и вещество, реагирующее с продуктом реакции, катализируемой им. В том месте геля, куда переместили исследуемый фермент, происходит определенная химическая реакция, которую в общем виде можно записать следующим образом:



По числу и расположению окрашенных фракций в геле можно судить о генах, кодирующих данный фермент у каждой особи, содержащейся в выборке. Независимая изменчивость в нескольких зонах активности предполагает, что эти зоны контролируются отдельными локусами. Интерпретация изоферментных спектров связана с представлением о кодоминантном типе наследования аллозимов (в гетерозиготе активны оба аллеля) и субъединичной структуре соответствующих ферментов. Гомозиготные особи, вне зависимости от структуры фермента, имеют на фореграммах однополосный фенотип. Гетерозиготы по локусам, кодирующим мономерные ферменты, состоящие из одного полипептида, обнаруживают двуполосные фенотипы с характерным распределением активности между полосами в отношении 1 : 1 (рис. 1.2). Для димерных ферментов, состоящих из двух инертных субъединиц, электрофоретических вариантов у гетерозигот будет три, учитывая свободную комбинаторику субъединиц, с распределением активности в отношении 1 : 2 : 1 (рис. 1.2). Для гетерозигот тетрамерных ферментов типичен пятиполосный фенотип с интенсивностями, распределяющимися пропорционально соотношению 1 : 4 : 6 : 4 : 1.

Кроме взаимодействия аллельных продуктов, имеются некоторые причины, приводящие к возникновению сложных спектров. Мультимерные ферменты, продукты разных неаллельных генов, нередко образуют межлокусные гетеромультимеры (гетеродимеры, гетеротетрамеры и т. д.). В этом случае на геле появляются дополнительные «гибридные» зоны активности, промежуточные по подвижности между зонами, контролируемыми отдельными локусами. К усложнению анализа электрофореграмм приводит и наличие так называемых «ноль-аллелей», когда в результате мутаций синтез субъединицы или не происходит, или белок образуется, но не обладает ферментной активностью. Эффект такого гена выявляется по отсутствию зоны активности на электрофореграмме, в гетерозиготном состоянии такой аллель может быть обнаружен в случае неполного доминирования нормального аллеля («эффект дозы»). Эффекты дозы гена также выявляются на фореграммах в случае полиплоидии. Основы генетики изоферментов подробно изложены в ряде оригинальных работ и обзоров [Левитес; Гончаренко; и др.].

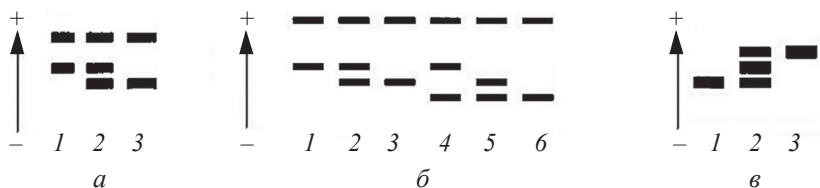


Рис. 1.2. Генетически контролируемые электрофоретические варианты белков:

а – гемоглобин моллюска *Anadara trapezia*: 1, 3 – гомозиготные генотипы, 2 – гетерозигота. Локус *Hb1* мономорфен; *б* – эстераза ракообразного *Mysis relicta*: 1, 3, 6 – гомозиготы, 2, 4, 5 – гетерозиготы. Фермент имеет мономерную структуру, гетерозиготы выявляются двумя фракциями активности фермента; *в* – 6-фосфоглюконатдегидрогеназа перепела *Coturnix coturnix*: 1, 3 – гомозиготы, 2 – гетерозигота. Фермент имеет димерную структуру, поэтому у гетерозиготы наблюдается три фракции активности, т. е. формируются гибридные молекулы, представленные средней полосой [Алтухов, с изм.]

Метод аллозимного анализа обладает значительно большей разрешающей способностью при исследовании изменчивости в популяциях, чем разнообразия по морфологическим признакам. Однако и он не оценивает все возможные варианты аллелей, присутствующие в популяциях. Аллозимы с одинаковой подвижностью в геле могут кодироваться разными аллелями, тогда как синонимичные триплеты, с заменой нуклеотида в третьем положении, не приводят к замещению аминокислотных остатков, т. е. кодируют одну и ту же аминокислоту. Также некоторые аминокислотные замены не проявляются электрофоретически, поскольку лишь пять из двадцати аминокислот влияют на суммарный заряд белковой молекулы, зависящий от соотношения числа отрицательно заряженных остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот и положительно заряженных лизина, аргинина и гистидина. Тем не менее электрофоретический анализ изоферментов позволяет не только различать аллельные замены вследствие генных, или точечных, мутаций, а также мутационно подобных событий – внутрицистронной рекомбинации на уровне полиаллельных генов, но и выявлять эффект более крупных реорганизаций генетического материала, к которым относятся хромосомные мутации и мутации полиплоидии, затрагивающие геном в целом [Алтухов].

Среди других классов наследуемых генетических маркеров аллозимы обладают несомненным преимуществом, так как демонстрируют простое менделевское наследование, т. е. контролируются моногенно (один ген – один фермент) и экспрессируются кодоминантно, так что в подавляющем большинстве случаев легко диагностируются все генотипы, как гомозиготные, так и гетерозиготные. Так как в настоящее время наследование изоферментов уже описано у многих таксонов, при анализе нового организма часто нет необходимости проводить скрещивания, поскольку данные по близкородственным видам дают достаточно надежную информацию о наследовании. Изоферменты как первые из разработанных генетических маркеров широко применяются во многих областях популяционно-генетических исследований и до настоящего времени поставляют наиболее значительные массивы данных о генетических процессах в популяциях, особенно в тех областях, где требуются полная генетическая информация (генотипы по кодоминантным локусам).

Лабораторная работа 1

Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях

Материалы и оборудование: камера для вертикального электрофореза, заливочное устройство, источник тока, автоматические пипетки, мерные пробирки на 15 мл и 50 мл, наконечники для пипеток, гребенки для геля.

Растворы:

1) 1,5 М буфер для нижнего (разделяющего) геля, pH 8,8–8,9 (18,2 г трис·(трис(гидроксиметил)аминометан) растворить в 100 мл воды, довести pH до 8,8 с помощью HCl конц.);

2) 1,25 М буфер для верхнего (концентрирующего) геля, pH 6,8 (15,1 г трис растворить в 100 мл воды, довести pH до 6,9 с помощью HCl конц.);

3) буфер для проведения электрофореза (электродный, $\times 10$), pH 8,2–8,3 (в 1 л воды растворить: 6 г трис, 28,8 г глицина, 2 г доде-

цисульфата натрия). При использовании буфер разводится деионизированной водой в десять раз;

4) 20 % персульфат аммония (ПСА), катализатор полимеризации (200 мг ПСА растворить в 1 мл воды). Хранить готовый раствор в холодильнике не более недели, беречь от света;

5) 30 % сток-раствор акриламида-бисакриламида (29 г акриламида и 1 г метиленабисакриламида растворить в воде и затем довести до 100 мл);

6) 0,65 М буфер для солюбилизации и инкубации белковых проб:

а) для денатурирующих условий: 0,785 г трис, 3 мл 30 % глицерина, 2,5 мг бромфенолового синего растворить в воде и довести до 10 мл;

б) для денатурирующих условий: 0,785 г трис, 3 мл 30 % глицерина, 2,5 мг бромфенолового синего и 1 г ДСН растворить в воде и довести до 10 мл.

Перед использованием оба концентрированных раствора следует развести в 5 раз, добавить 2 мг дитиотреитола (ДТТ) на 1 мл буфера.

Важно! Все растворы для электрофореза готовят на деионизированной воде тQ. Примесь ионов тяжелых металлов нарушает полимеризацию геля.

Ход работы:

1. Приготовление сток-раствора для заливки пробки: смешать 3 мл 30 % акриламида-бисакриламида, 1,5 мл 1,5 М буфера для разделяющего геля, 1,5 мл воды. Непосредственно перед заливкой добавить 25 мкл ПСА и 5 мкл ТЕМЕД.

2. Приготовление сток-раствора для концентрирующего геля (5 %): смешать 0,63 мл 1,25 М буфера для концентрирующего геля, 0,83 мл 30 % сток-раствора акриламида-бисакриламида и 3,42 мл воды. Непосредственно перед заливкой добавить 20 мкл ПСА и 3 мкл ТЕМЕД.

3. Приготовление разделяющего геля (10 %): смешать 5 мл 1,5 М буфера для разделяющего геля, 6,6 мл 30 % сток-раствора акриламида-бисакриламида и 8,1 мл воды. Непосредственно перед заливкой добавить на 8 мл раствора 80 мкл ПСА и 8 мкл ТЕМЕД.

Растворы для приготовления гелей без ПСА и ТЕМЕД можно хранить в холодильнике 2–3 недели.

4. Подготовка и денатурация белковых проб. Белки из гомогената тканей желательно экстрагировать буфером для приготовления проб (с SDS). Полученную взвесь центрифугируют при 10 000 g 15 мин и дальше работают с супернатантом. Белковые пробы, полученные иным способом, смешивают с буфером для приготовления проб в соотношении 1 : 2 или 1 : 3 (по объему). Затем подготовленные пробы погружают в кипящую воду и нагревают 2–5 мин при 95–100 °С.

5. Заливка геля:

5.1. Вымыть камеру детергентом, ополоснуть дистиллированной водой, высушить. Собрать камеру для проведения гель-электрофореза.

5.2. Добавить к нужному количеству раствора для пробки необходимое количество ПСА и ТЕМЕД. Немедленно залить пробку. После окончания полимеризации пробки добавить в раствор для нижнего (разделяющего) геля ПСА и ТЕМЕД.

5.3. Немедленно залить нижний (разделяющий) гель. Налить осторожно, не смешивая, водонасыщенный *n*-бутанол (1–2 см).

5.4. После завершения полимеризации отобрать *n*-бутанол тонкой пипеткой, 2–3 раза хорошо сполоснуть получившийся карман дистиллированной водой до удаления запаха спирта, удалить остатки воды фильтровальной бумагой, не касаясь геля.

5.5. Вставить (не до конца!) гребенку между стеклами (до дна кармана должно остаться 0,5–1 см).

5.6. Добавить в раствор для верхнего (концентрирующего) геля ПСА и ТЕМЕД.

5.7. Залить верхний (концентрирующий) гель. После полимеризации установить верхнюю камеру в поддон, залить разбавленный буфер для проведения гель-электрофореза, вытащить гребенку.

5.8. Немедленно промыть лунки шприцом с $\times 1$ электродным буфером, поправить изогнувшиеся перегородки между карманами (можно иглой шприца).

6. Внести в карманы необходимое количество проб; подсоединить камеру к источнику тока. При разделении в концентрирующем геле задать напряжение 50 В, силу тока 50 мА, в разрешающем – соответственно 100 В, 80 мА.

Лабораторная работа 2

Проявление электрофореграмм с помощью красителя кумасси

Зоны разделившихся белков необходимо проявить – сделать видимыми невооруженным глазом.

Разделившиеся зоны белков фиксируют осаждением смесью уксусной кислоты и этанола (реже – метанола) или раствором ТХУ и окрашивают, используя раствор красителя. Фиксация предотвращает размывание зон из-за диффузии белковых молекул в геле. Используют такие красители, как амидочерный, кумасси бриллиантовый голубой (марки G-250, R-250), нитрат серебра. Интенсивность окраски полос пропорциональна количеству белка в зоне.

По сравнению с другими красителями кумасси имеет следующие преимущества:

- его чувствительность выше, чем у амидочерного (для R-250 – 0,3–1,0 мкг, для G-250 – около 10 нг белка в полосе);
- зависимость интенсивности окраски от концентрации белка остается линейной в более широком диапазоне концентраций, чем для амидочерного;
- значительно дешевле и проще в использовании, чем нитрат серебра, и не требует особо чистой дистиллированной воды.

Материалы и оборудование: шприц с иглой, лезвие безопасной бритвы и скальпель для отделения геля, лоток для окраски геля, шейкер, водяная баня.

Растворы и реактивы:

- 1) кумасси ярко-синий марок R-250 или G-250;
- 2) этанол (300 мл);
- 3) ледяная уксусная кислота (150 мл);
- 4) ТХУ, 12 % раствор (200 мл).

Ход работы:

Окраска кумасси ярко-синим R-250, совмещенная с фиксацией.

1. Подготавливают кипящую водяную баню, установленную в вытяжном шкафу.

2. Готовят раствор красителя следующего состава: этанол – 300 мл, ледяная уксусная кислота – 60 мл, кумасси R-250 – 0,7 г. При необходимости фильтруют (под тягой).

3. Гель помещают в стакан и заливают пятикратным (относительно объема геля) объемом раствора красителя. Стакан с гелем помещают на водяную баню в вытяжной шкаф и кипятят 10 мин. При комнатной температуре окраска также возможна, но займет 4–5 ч.

4. Сливают краситель из стакана, промывают гель дистиллированной водой и заливают 7 % уксусной кислотой. Кипятят на водяной бане 5 мин, затем дважды меняют раствор уксусной кислоты на свежий и повторяют кипячение. Добавление в раствор кусочков фильтровальной бумаги, сорбирующей краситель, ускоряет отмывку.

Лабораторная работа 3

Определение молекулярной массы белка в геле

Белок, четвертичная структура которого состоит из нескольких субъединиц, после обработки концентрированным раствором анионного детергента додецилсульфата натрия (SDS) в присутствии β -меркаптоэтанола распадается на отдельные полипептидные цепи. Белки из единственной субъединицы образуют один полипептид. Взаимодействие любых полипептидов с SDS придает им отрицательный заряд, что обеспечивает их движение к аноду при использовании электрофореза в ПААГ. Присутствие додецилсульфата натрия обеспечивает линейную зависимость между молекулярной массой белков и их подвижностью. Чем больше молекулярная масса белка, тем медленнее он продвигается через поры геля и, таким образом, за единицу времени проходит меньшее расстояние в геле.

Расстояние, пройденное белком в геле, называется электрофоретической подвижностью. Она обозначается R_f и определяется как отношение расстояния от дна лунки до полосы белка к расстоянию от дна лунки до лидирующего красителя. Таким образом, всегда $R_f < 1$.

Для определения массы неизвестного белка необходимо сравнить его электрофоретическую подвижность с подвижностью нескольких белков с известной массой (маркером молекулярных масс).

Материалы и оборудование: линейка, ПК, проявленный гель с электрофореграммой белков.

Ход работы:

1. Рассмотрите гель. Найдите на нем маркер молекулярных масс, определите по каталогу фирмы-производителя, какую массу имеют белки-маркеры.

2. С помощью линейки определите длину геля и пробег каждого из маркерных белков.

3. Рассчитайте электрофоретическую подвижность для маркерных пептидов, занесите данные в электронную таблицу.

4. Найдите логарифм молекулярной массы референсных пептидов, постройте график линейной зависимости логарифма массы белка от его электрофоретической подвижности.

5. Выберите на геле в дорожках с образцом интересующие вас белки. Определите их электрофоретическую подвижность. Найдите, где на полученном графике (см. пункт 4) будет находиться точка искомого белка. Определите массу белка.

Лабораторная работа 4

Нативный электрофорез. Выявление изоферментных спектров пероксидазы

Выявление изоферментов пероксидазы проводится в соответствии с описанием, данным в работе А. И. Ермакова с соавт. [Ермаков и др., с. 41–45]. Визуализация изоформ происходит в виде синих полос на прозрачном геле.

Материалы и оборудование: лоток для проявления геля, автоматические пипетки и наконечники к ним, камера для вертикального электрофореза, источник тока, шейкер.

Растворы и реактивы:

- 1) 0,5 % уксусная кислота;
- 2) трис-глициновый буфер, рН 8,3 (0,6 г трис, 2,34 г глицина, 0,1 г борной кислоты растворить в 1 л воды);
- 3) бензидиновый реагент (125 мг основного или солянокислого бензидина растворить в 1 мл ледяной уксусной кислоты и после полного растворения довести объем водой до 50 мл);
- 4) 0,1 % раствор перекиси водорода (0,5 мл 3 % перекиси водорода добавить к 14,5 мл воды).

Ход работы:

1. Для проведения электрофореза пробы выравнивают по содержанию белка (обычно около 10 мкг). Электрофорез проводят в 10 % полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях согласно методике Лэммли (Laemmli, p. 681), исключая ДСН из всех растворов. Разделение проводят при напряжении 2 В/см² (см. лабораторную работу 1). В качестве электродного буфера используют трис-глициновый буфер (рН 8,3) с добавлением борной кислоты в концентрации 0,1 %.

2. После проведения электрофореза гель помещают в раствор 0,5 % уксусной кислоты. Через 5–10 мин, слив уксусную кислоту, гель заливают свежеприготовленным бензидиновым реагентом и оставляют на шейкере на 20 мин.

3. Бензидиновый реагент удаляют, и гель 1 раз споласкивают 0,5 % раствором уксусной кислоты.

4. Гель заливают 0,1 % раствором перекиси водорода и наблюдают появление синих полос изоформ пероксидазы. При появлении окраски перекись водорода сливают, гель сразу фотографируют или сканируют, так как окраска не устойчива.

Лабораторная работа 5

Выявление изоферментных спектров супероксиддисмутазы

Супероксиддисмутаза (СОД) – один из ключевых ферментов антиоксидантной защиты растений. Он катализирует превращение высокотоксичного супероксидного радикала в менее реакционноспособную перекись водорода.

Выявление изоформ супероксиддисмутазы в полиакриламидном геле проводят согласно методу, предложенному Бошаном и Фридовичем (Beauchamp, Fridovich, p. 277), с модификациями. Изоформы супероксиддисмутазы выявляются в виде светлых полос на фиолетовом фоне. Окрашивание геля в фиолетовый цвет обусловлено фотоиндуцированным свободнорадикальным окислением нитросинего тетразолия. Отсутствие окрашивания геля говорит об отсутствии свободных радикалов, устранение которых происходит за счет активности супероксиддисмутазы.

Материалы и оборудование: камера для вертикального электрофореза, источник тока, люминесцентная лампа, шейкер, лоток для окрашивания геля, скальпель, автоматические пипетки, накопники.

Растворы и реактивы:

1) 50 мМ К-Na-фосфатный буфер, pH 7,8. Для приготовления К-Na-фосфатного буфера необходимы следующие stock-растворы: 0,2 М KH_2PO_4 (1,36 г KH_2PO_4 довести до 50 мл водой), 0,2 М NaOH (400 мг NaOH довести до 50 мл водой). Приготовление 50 мМ К-Na-фосфатного буфера, pH 7,8: 25 мл 0,2 М KH_2PO_4 и 22,25 мл 0,2 М NaOH смешать и довести до 100 мл водой. Проверить pH раствора и, если необходимо, скорректировать с помощью концентрированной H_3PO_4 или 5 % NaOH;

2) трис-глициновый буфер, pH 8,3: 0,6 г трис-аминометана, 2,34 г глицина, 0,1 г борной кислоты растворить в 1 л воды);

3) окрашивающий раствор (45 мг этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 1 мг рибофлавина растворить в 40 мл 50 мМ

К-Na-фосфатного буфера (рН 7,8). Непосредственно перед загрузкой геля добавить 4 мг нитросинего тетразолия.

Оборудование: прибор для проведения электрофореза, источник тока, холодильник, люминесцентные лампы, фотоаппарат.

Ход работы:

1. Для проведения электрофореза пробы выравнивают по содержанию белка (обычно около 20 мкг). Разделение белков проводят в 10 % полиакриламидном геле в электродном трис-глициновом буфере (см. лабораторную работу 1) без додецилсульфата натрия (ДСН), по методу Лэммли [Laemmli, p. 277–278]. Разделение проводят при 4° С, помещая камеру в холодильник, останавливая процесс разделения сразу после того, как лидирующий краситель полностью выйдет из разделяющего геля и пробки.

2. После электрофореза гель помещают в окрашивающий раствор и инкубируют 20 мин в темноте при комнатной температуре. Затем гель переносят в чистую прозрачную емкость и облучают люминесцентными лампами дневного света до появления нужной четкости и интенсивности окрашивания. При этом происходит изменение окраски геля от светло-желтой до фиолетовой. Изоформы супероксиддисмутазы проявляются в виде светлых неокрашенных полос.

3. Реакция останавливается выключением света. Гель быстро фотографируют или сканируют.

Лабораторная работа 6

Изоферментный анализ генетического полиморфизма в популяции растений

Материалы и оборудование: свежие или замороженные органы растений (листья, почки, стебли, луковичы, клубни и др.), центрифуга с охлаждением, ступки с пестиками, оксид алюминия, вертикальная камера для заливки геля и электрофореза, охлаждающий термостат или ледяные блоки для охлаждения.

Если используются замороженные органы растений, их необходимо растирать в жидком азоте.

Растворы:

1) экстрагирующий буфер (на 100 мл): трис-НСl 1М – 10 мл, аскорбиновая кислота – 100 мг, бычий сывороточный альбумин – 20 мг, α -аминокапроновая кислота – 20 мг, сахароза – 16 г, Tween-80 – 1 мл, PVP 2 % – 2 г, β -меркаптоэтанола – до 0,1 % (добавляется непосредственно перед экстракцией). Хранится в холодильнике;

2) буфер трис-НСl 8,0 (для покраски): трис – 48,4 г, H_2O – около 1 л, HCl – до pH 8,0, H_2O – до 2 л;

3) буфер ТЕВ 8,0 для камеры: трис – 84 г, ЭДТА (трилон В) – 7,2 г, борная кислота – 60 г, H_2O – до 2 л. Перед заливкой в камеру разводить водой 1 : 2. Использовать в качестве нижнего и верхнего буферов;

4) буфер 8,6 (для заливки гелей): трис – 43 г, ЭДТА – 3,5 г, борная кислота – 22 г, H_2O – до 1 л;

5) концентрирующий гель (на 65 мл): раствор акриламида (верхний) – 17 мл, буфер ТЕВ для гелей – 13 мл, вода дистиллированная – 35 мл, персульфат аммония – 54 мг;

6) разрешающий гель (на 200 мл): раствор акриламида (нижний) – 66 мл, буфер ТЕВ для гелей – 62 мл, вода дистиллированная – 72 мл, персульфат аммония – 180 мг;

7) раствор акриламида (нижний): акриламид – 192 г, биакриламид – 8 г, H_2O – до 1 л;

8) раствор акриламида (верхний): акриламид – 192 г, биакриламид – 16 г, H_2O – до 1 л.

Растворы для выявления зон активности некоторых ферментов (Левитес, 1986)

Аконитаза (АКО): 50 мкг *цис*-аконитовой кислоты в 12,5 мл трис-НСl буфер (pH 8,0), содержащего $MgCl_2$ (1М) – 100 мкл, МТТ – 0,5 мл, ФМС – 0,3 мл; довести pH до 7–8, агар (1 %) – 12,5 мл (температура агара не должна быть выше 45 °С). Добавить перед употреблением НАДФ – 10 мкг, изоцитратдегидрогеназу – 2 мкл; проявляется в термостате при 37 °С.

Алкогольдегидрогеназа (ADH): 1 мл этанола в 50 мл трис-НСl буфера (рН 8,0), содержащего НАД – 15 мкг, МТТ – 1 мл, ФМС – 0,5 мл; 37 °С.

Аспаратаминотрансфераза (GOT): трис-НСl буфер, рН 8,0 (до 100 мл); пиридоксаль-5-фосфат – 8 мг; *L*-аспарагиновая кислота – 340 мг; прочный синий ББ соль – 300 мг; α -кетоглутаровая кислота – 150 мг; 37 °С.

Изоцитратдегидрогеназа (IDH): 20 мг изоцитрата в 12,5 мл трис-НСl буфера (рН 8,0), содержащего НАДФ – 10 мкг, $MgCl_2$ (1M) – 100 мг, МТТ – 0,5 мл, ФМС – 0,3 мл, агар 1 % – 12,5 мл; 37 °С.

Формиатдегидрогеназа (FDH): трис-НСl буфера (рН 8,0) – до 50 мл, формиат – 1 г, аспарагиновая кислота – 200 мг, α -кетоглутаровая кислота – 50 мг, пиридоксаль – 4 мг; непосредственно перед употреблением добавить Fast Blue – 100 мг, если необходимо, профильтровать смесь; 37 °С.

Фосфоглюкоизомераза (PGI): трис-НСl буфера (рН 8,0) – 12,5 мл, фруктоза-6-фосфат – 10 мкг, $MgCl_2$ (1M) – 100 мкл, НАДФ – 10 мкг, глюкоза-6-фосфотдегидрогеназа – 4 мкл, МТТ – 0,5 мл, ФМС – 0,3 мл, агар 1 % – 12,5 мл; 37 °С.

6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD): трис-НСl буфера (рН 8,0) – 12,5 мл, 6-фосфоглюконовая кислота – 10 мкг, НАДФ – 10 мкг, $MgCl_2$ (1M) – 100 мкл, МТТ – 0,5 мл, ФМС – 0,3 мл, агар – 12,5 мл; 37 °С.

Ход работы:

1. Для экстракции ферментов 120–160 мг свежих листьев или других частей растений растереть в 1 мл экстрагирующего буфера в ступке. Гомогенизированный образец перенести в пробирку «Эппендорф». В том случае, если электрофорез не проводится сразу после экстракции, образцы необходимо хранить в морозильнике.

2. Гомогенизированные образцы центрифугировать 5 мин (13 тыс. об/мин при +4 °С), добавив перед этим 200 мл четыреххлористого углерода (CCl_4). Все операции проводить таким образом, чтобы температура образцов не превышала 15 °С, иначе активность ферментов снижается.

3. Собрать вертикальные камеры и залить их ПААГ гелем. Нижний слой – разделяющий гель, верхний слой – концентрирующий гель. После заливки первого геля наслаивается водонасыщенный *n*-бутанол для более ровной полимеризации. Перед заливкой концентрирующего геля устанавливают гребенки, формирующие ячейки для внесения образцов.

4. После полимеризации гребенки вынимаются и камера устанавливается в ванну с буфером. В саму камеру заливают электродный буфер. Камеру подключают к источнику тока и в течении 10–15 мин проводят предотгонку для удаления из буфера ионов.

5. В каждую ячейку геля сэмплером аккуратно вносится от 10 до 50 мкл образца, в одну из ячеек вносится краситель (например, хлопчатобумажный голубой). По движению красителя можно отслеживать движение образцов. Условия электрофореза: температура не должна превышать 15 °С; в низкой камере напряжение 150–180 В, сила тока – 299 мА, в высокой камере напряжение 100–220 В, сила тока – 299 мА.

6. Температура в камерах (+10 °С) поддерживается при помощи охлаждающего термостата и дополнительных охлаждающих элементов.

7. После электрофореза гели разрезают продольно на 4 слоя с помощью тонкой проволоки. Каждый срез помещают в отдельную кювету и окрашивают по соответствующей методике [Левитес; Гончаренко и др.].

Вопросы для самоконтроля

1. При каких условиях белки не способны перемещаться в электрическом поле?
2. Что такое изиозимы и в чем причина их появления?
3. Для чего при электрофорезе в гель и в буферы добавляют додецилсульфат натрия?
4. Как зависит электрофоретическая подвижность белка от его молекулярной массы?
5. Для чего необходимо получать изоферментные спектры белков?

6. Назовите методы визуализации белковых зон в гелях. Каковы достоинства и недостатки данных методов?

7. Какие носители могут быть применены для разделения белков электрофоретическим методом? В чем их достоинства и недостатки?

8. Какое вещество используется для получения поперечных сшивок в ПААГ?

9. Какие вещества используются для полимеризации акриламида?

10. Как можно варьировать диаметр пор в полиакриламидном геле?

11. Что такое изоэлектрическое фокусирование?

2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

2.1. Растительный материал для выделения ДНК

Выделять ДНК можно из свежих или замороженных (при -70 – -80 °C) растительных образцов, из частей растений, высушенных в силикагеле, или из гербарных образцов. Не любой гербарий подходит для выделения ДНК. Лучшие результаты достигаются в случае возраста гербария не более 30–40 лет и при условии его правильной и быстрой сушки.

Для выделения ДНК обычно используют листья растений, но в связи с тем, что разные органы растений могут иметь отличия в химическом составе, в том числе в содержании вторичных метаболитов, необходимо подбирать орган растения, из которого выделяется более качественная ДНК.

При выборе частей растения для выделения ДНК необходимо помнить о том, что нужно выбирать участки, не пораженные грибковыми и другими заболеваниями, чтобы избежать загрязнения проб чужеродной ДНК.

Если ДНК из образцов ткани не может быть экстрагирована в ближайшие 48 ч, образец должен быть заморожен при температуре от -20 до -80 °C или подвергнут сушке. Повторение циклов замораживания-оттаивания проводить не рекомендуется из-за возможности разрушения ДНК.

2.2. Особенности выделения ДНК из растительных объектов

В основе выделения ДНК лежат как физические, так и химические процессы. При выделении ДНК из растительных объектов необходимо дезактивировать клеточные ферменты, «удалить» запасные вещества, например, полисахариды и вторичные метаболиты:

алкалоиды, фенольные соединения, терпены, которые не просто мешают выделению ДНК, но и отрицательно влияют на ее качество [Рябушкина и др., с. 12]. Так, определенные группы полисахаридов при выделении ДНК образуют с ней вязкую желеподобную массу. Серьезное негативное воздействие оказывают окислители различной биохимической природы, а также фенольные соединения. В связи с многообразием метаболитов у представителей различных таксонов, а иногда и представителей одного рода растений, одного оптимального протокола изолирования ДНК не существует.

В целом выделение ДНК включает обязательные процедуры:

- разрушение клеток или лизис;
- удаление мембранных липидов;
- удаление вторичных метаболитов и запасных веществ;
- удаление белков;
- удаление РНК;
- осаждение ДНК.

Первый этап – **разрушение клеток, лизис**. В отличие от клеток животных, растительные клетки окружены прочной целлюлозной оболочкой. Активная физическая гомогенизация тканей должна разрушить клеточные оболочки, нарушить целостность клеток и внутриклеточных компартментов с целью освобождения компонентов этих компартментов, выделения их в экстрагирующий буфер. Разрушение тканей осуществляется в процессе растирания в ступке или с использованием гомогенизатора. Вследствие того, что нуклеиновые кислоты легко разрушаются на стадии очистки, время между гомогенизацией пробы и добавлением буфера должно быть минимальным.

Растительные ткани содержат большое количество полисахаридов, в том числе целлюлозу клеточных стенок, крахмал; полисахариды в комплексе с белками, а также белки в комплексе с липидами, комплексы белков с нуклеиновыми кислотами, полифенолы и другие соединения. Это значительно затрудняет изолирование ДНК из многокомпонентной смеси, элементы которой могут как физически связывать, так и химически разрушать молекулы нуклеиновой кислоты. Погружение тканей в жидкий азот с последующей

гомогенизацией облегчает разрушение клеток, тормозя при этом все биохимические и физические процессы, повреждающие ДНК. Если исходная ткань была заморожена, при гомогенизации ни в коем случае не следует допускать ее оттаивания.

Для разрушения клеточных оболочек и мембран гомогенизированный образец обрабатывается экстрагирующим буфером, который обычно содержит EDTA, трис-HCl и СТАВ.

Удаление липидов и мембранных белков. Гомогенизация тканей в присутствии детергентов (поверхностно активных веществ) и хаотропных агентов способствует высвобождению мембранных липидов, белков и лизису клеток. В буферных растворах детергенты разрушают фосфолипидный слой мембран, переводят в растворимое состояние мембранные белки, тем самым разрушая липидно-белковые комплексы, при этом ДНК экстрагируется в буфер, т. е. переходит в растворимое состояние. Выбор детергентов зависит от целей исследования.

Классический катионный детергент, используемый при экстракции ДНК, – *цетилтриметил бромид аммония* (СТАВ), содержащийся в экстрагирующем буфере. СТАВ лизирует клеточную мембрану, эффективно разрушает ДНК-белковые комплексы. При определенной концентрации соли (NaCl) СТАВ образует нерастворимый комплекс с нуклеиновыми кислотами.

Анионные детергенты, например *додecilсульфат натрия* (SDS), при значениях pH ниже изоэлектрической точки белка образуют с белками нерастворимые осадки. *Додecilсульфат натрия* и *меркаптоэтанол* осаждают белки и полисахариды как нерастворимый комплекс. Меркаптоэтанол разрушает дисульфидные мостики, в том числе и в белках, с нарушением их третичной и четвертичной структуры и действует как биологический антиоксидант, ингибируя окислительные процессы, которые напрямую или косвенно повреждают ДНК. Поскольку наличие дисульфидных мостиков поддерживает стабильность нуклеаз, меркаптоэтанол элиминирует активность освобождаемых при лизисе клеток ферментов. Реже используются неионные детергенты, такие как *Тритон X-100*, но так как они более «мягкие», белки могут оставаться интактными.

Буфер экстракции может содержать *дитиотреитол* (ДТТ), который так же, как и меркаптоэтанол, является сильным восстанавливающим агентом. Присутствие ДТТ способствует разрушению дисульфидных связей, предотвращая образование димеров «тиолированной» ДНК в растворе.

Нагревание и присутствующие в буфере для экстракции хаотропные агенты, такие как соли, денатурируют макромолекулы, нарушая водородные связи, гидрофобные взаимодействия и силы Ван-дер-Ваальса. Высокие концентрации солей осаждают полисахариды, которые в противном случае могут образовывать с ДНК желеобразный комплекс. В присутствии в буфере экстракции *этилендиаминтетрауксусной кислоты* (EDTA) – хелатирующего агента, связывающего ионы металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} и др.), происходит дезактивация металл-зависимых ферментов, находящихся в растительных экстрактах. Наиболее важным является то, что EDTA связывает магний, являющийся кофактором фермента ДНКазы. При связывании магния снижается активность имеющихся ДНК (см.: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu>).

Удаление вторичных метаболитов. Растения характеризуются накоплением в определенных органах большого количества вторичных метаболитов (в первую очередь это относится к ароматическим и лекарственным растениям), которые оказывают существенное негативное влияние на процедуры изолирования, а в дальнейшем могут являться ингибиторами ПЦР-реакции. Полифенолы, присутствующие во многих растениях, при гомогенизации тканей вступают в реакции окисления, ковалентно связываются с белками и нуклеиновыми кислотами, осадок ДНК становится коричневым, такие образцы ДНК непригодны для дальнейших исследований. Связать фенолы и не допустить их взаимодействия с нуклеиновыми кислотами можно с помощью содержащихся в экстрагирующем буфере полимеров: поливинилпирролидона (PVP) или поливинил-поливинилпирролидона (PVPP, модификация PVP с поперечными сшивками).

Удаление белков. Степень связывания участков ядерной ДНК с белковыми комплексами зависит от транскрипционного статуса

этих участков, транскрипционно неактивная ДНК наиболее плотно «упакована» с соответствующими белками, представляя структуру гетерохроматина. Поэтому следующий важный этап – удаление белков с помощью **протеаз**. Щелочные протеазы гидролизуют белки, в том числе гистоны, связанные с ДНК, ферменты клеточного содержимого, в том числе нуклеазы. В качестве примера можно привести широко применяемую протеиназу К, которая эффективно инактивирует нуклеазы, будучи устойчивой при этом к денатурирующим (SDS, мочевины), хелатирующим (ЭДТА) и сульфгидрильным агентам, а также к ингибиторам трипсина и хомотрипсина. Данная протеаза работает в широком диапазоне pH (от 4 до 12 единиц). Более того, денатурирующие агенты повышают доступность пептидных связей белков для протеиназы К. Белки также могут быть осаждены солями: ацетатом аммония, натрия, калия – или до осаждения ДНК экстрагированы смесью фенол/хлороформ.

Удаление РНК. Большие количества РНК в образцах ДНК могут связывать Mg^{+2} и тем самым снижать активность ДНК-полимеразы в ПЦР и, следовательно, количество продукта реакции. РНК может быть удалена на соответствующем этапе осаждением хлоридом лития или добавлением **РНКазы** к растворенному в воде осадку нуклеиновых кислот. Инкубация при 37 °C способствует гидролизу РНК в образцах. Затем ДНК должна быть переосаждена спиртом, так как мелкие фрагменты РНК после обработки РНКазой могут послужить «затравками» в ПЦР-реакции.

Осаждение ДНК. Нуклеиновые кислоты из экстракционного буфера осаждают охлажденным этанолом или изопропанолом, поскольку полярные молекулы ДНК нерастворимы в неполярном спирте. Концентрация спирта при переосаждении не должна быть меньше 70 % во избежание потерь ДНК.

Если в осажденном концентрированном экстракте ДНК все еще присутствуют ингибиторы ПЦР, может быть использована смесь фенол/хлороформ/изоамиловый спирт; при этом смесь разделяется на фазы: водный раствор, в котором содержатся нуклеиновые кислоты; интерфаза вода/фенол – содержатся белки и углеводы; фаза хлороформ/изоамиловый спирт – растворяются липиды. Водный

экстракт переносится в чистую пробирку, и нуклеиновая кислота может быть осаждена 3 М ацетатом натрия, с последующим промыванием осадка в спирте (70 % и 100 % этанол). Фенол, хлороформ и изоамиловый спирт – токсичные соединения и требуют утилизации после использования, поэтому их применение становится все более редким. Коммерческие наборы для выделения ДНК не содержат токсичные фенол и хлороформ, но имеют высокую стоимость.

ДНК после экстракции может храниться в буферах, совместимых с ПЦР. Следует учитывать, что, например, ТЕ-буфер содержит ЭДТА, связывающий ионы магния, необходимого для работы ДНК-полимеразы (во время ПЦР-реакции). В стерильной дистиллированной воде ДНК представляет собой слабую кислоту, что в конечном итоге приводит к авторазрушению. Фосфатные буферы также могут влиять на структуру ДНК. Трис-буфер сам по себе не оказывает влияния на *Taq*-полимеразу, но при внесении ДНК в этот стабилизирующий буфер может сдвинуться pH реакционной смеси ПЦР.

Экстрагированная ДНК может долгое время храниться при -80°C . Для непродолжительного хранения ДНК достаточно 4°C . Крайне не рекомендуется неоднократное замораживание–оттаивание препаратов ДНК, ведущее к разрывам молекулы.

Таким образом, метод экстракции ДНК должен быть достаточно простым, удобным, недорогим и при этом воспроизводимым. Полученная чистая ДНК должна быть «доступна» для ферментов рестрикции и реакций амплификации, отвечать требованиям последующего клонирования, секвенирования, гибридизации и др.

Лабораторная работа 7

Метод солевой экстракции ДНК с фенольной депротенинизацией

Материалы и оборудование: растительная ткань, замороженная жидким азотом, свежая или высушенная в гербарии или силикагеле, ступки с пестиками, центрифуга, микроцентрифужные

пробирки, вытяжной шкафа, твердотельный термостат («Термит»), вортекс.

Реактивы:

1) трис-НСl 1 М буфер: H_2O – примерно 70 мл, трис – 12,1 г, НСl конц. – 8 мл сразу, затем по 100 мкл до достижения требуемого значения рН (проверить с помощью рН-метра или индикаторной бумаги). Довести водой до 100 мл;

2) ЭДТА (рН 8,0) – 0,5 М: H_2O – примерно 70 мл, ЭДТА – 14,6 г. Довести рН сухим NaOH до 8,0. Использовать рН-метр или индикаторную бумагу. Довести водой до 100 мл;

3) буфер TE: трис-НСl 1 М (рН 8,0) – 1 мл, ЭДТА 0,5 М (рН 8,0) – 20 мкл, вода бидистиллированная или milliQ – до 100 мл;

4) экстрагирующий буфер: трис-НСl (рН 7,5) – 200 мМ, NaCl – 250 мМ, ЭДТА – 25 мМ, лаурилсульфат или додецилсульфат натрия (SDS) – 0,5 %.

Ход работы:

1. 30–40 мг растительной ткани гомогенизировать. Для этого растительную ткань заморозить жидким азотом и растереть в ступке с экстрагирующим буфером, а затем поместить в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, залить 500 мкл экстрагирующего буфера. Пробирки поместить в термостат на 10 мин при $T = 65^\circ\text{C}$.

2. Дать пробиркам остыть и центрифугировать 5 мин при 10 тыс. об/мин.

3. Отобрать супернатант (жидкость) и поместить в другую пробирку на 1,5 мл, добавить 250 мкл фенола, забуференного 1 М трисом. Встряхнуть, центрифугировать 5 мин при 15 тыс. об/мин.

4. Отобрать супернатант в другую пробирку, не задевая интерфазу, добавить равный объем хлороформа, встряхнуть, центрифугировать 2–3 мин при 15 тыс. об/мин.

5. Отобрать супернатант в чистую пробирку, добавить 500 мкл изопропанола, тщательно перемешать, поставить в морозильник на 20 мин. Центрифугировать 10 мин при 15 тыс. об/мин, слить супернатант.

6. К осадку добавить 1 мл 70 % этанола, встряхнуть, центрифугировать 5 мин при 15 тыс. об/мин, слить спирт, повторить операцию.

7. Подсушить осадок в пробирках с открытыми крышками. Растворить ДНК в 200 мкл буфера TE. Хранить в морозильнике.

Лабораторная работа 8

Выделение суммарной ДНК из растений по Devey et al. с небольшими модификациями [Semerikov, Lascoux, p. 1114]

Материалы и оборудование: растительная ткань, замороженная жидким азотом, свежая или высушенная в гербарии или силикагеле, ступки с пестиками, центрифуга, микроцентрифужные пробирки, вытяжной шкаф, твердотельный термостат («Термит»).

Реактивы:

1) экстрагирующий буфер: трис-HCl 1 М (pH 8,0) – 10 мл, ЭДТА 0,5 М (pH 8,0) – 1 мл, полиэтиленгликоль – 10 г, сорбитол – 6,8 г, лаурилсаркозин – 1 г, альбумин бычий сывороточный – 100 мг, аскорбиновая кислота – 100 мг, Tween-80 – 1 мл, вода – до 100 мл, 2-меркаптоэтанол – 0,1 %, добавляется непосредственно перед использованием;

2) 5 М NaCl: NaCl – 29 г, H₂O – до 100 мл;

3) 10 % СТАВ: СТАВ – 10 г, вода – до 100 мл. Размешать в холодной воде, а затем слегка подогреть суспензию в микроволновой печи или на водяной бане для растворения СТАВ.

Ход работы:

1. 40–50 мг сухой или 150 мг свежей ткани растереть в ступках. Если ткань была заморожена, растирать нужно в жидком азоте. Добавить 800 мкл экстрагирующего буфера либо, используя пестик, произвести гомогенизацию непосредственно в буфере. Гомогенат тщательно перемешать.

2. В смесь добавить 390 мкл 5 М NaCl и 290 мкл предварительно разогретого 10 % СТАВ и инкубировать 30 мин при $T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ в твердотельном термостате, периодически перемешивая.

3. Пробирку охладить до комнатной температуры и добавить 300–500 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1), тщательно перемешать и центрифугировать 20 мин при 13 тыс. об/мин ($T = 18\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Процедуру повторять до получения прозрачной водной фазы.

4. С помощью дозатора отобрать 500–1000 мкл прозрачной фазы в новые пробирки и добавить к ней 600 мкл изопропанола. Далее осторожно перемешивать в течение 2 мин. Поместить в холодильник не менее чем на 30 мин, после чего центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение 10 мин.

5. Изопропанол слить и добавить 500 мкл 70 % этанола, перемешать и центрифугировать 1–2 мин, после чего этанол слить и подсушивать при открытых крышках пробирок до полного испарения спирта.

6. Растворить в 200 (100) мкл буфера ТЕ. Полученную ДНК хранить при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ при долгосрочном хранении и от 0 до $+3\text{ }^{\circ}\text{C}$ – при временном.

Лабораторная работа 9

Выделение геномной ДНК (с мочевиной)

Материалы и оборудование: растительная ткань, замороженная жидким азотом, свежая или высушенная в гербарии или силикагеле, ступки с пестиками, центрифуга, микроцентрифужные пробирки, вытяжной шкаф, твердотельный термостат («Термит»), вортекс, автоматические пипетки, наконечники для пипеток в штативе.

Растворы: экстрагирующий буфер (хранить при комнатной температуре): SDS – 2 % (w/v), ЭДТА – 10 мМ, NaCl – 0,35 М, трис-HCl (pH 8,0) – 0,1 М, мочевины – 7 М.

Ход работы:

1. Тщательно гомогенизировать образец в 100 мкл экстрагирующего буфера в пробирке «Эппендорф» с помощью пестика.
2. Довести объем буфером до 300 мкл.
3. Добавить 300 мкл смеси фенол–хлороформ (1 : 1), встряхнуть на вортексе.
4. Цетрифугировать 5 мин при 10 тыс. об/мин.
5. Отобрать верхнюю водную фракцию в новую пробирку, не задевая интерфазу.
6. Добавить равный объем хлороформа, встряхнуть на вортексе.
7. Отцентрифугировать, отобрать верхнюю фазу в новую пробирку.
8. Добавить двойной объем холодного этанола или равный объем изопропанола и поставить в холодильник на 30 мин.
9. Отделить образовавшийся осадок центрифугированием на максимальной скорости 10–15 мин.
10. Осторожно слить супернатант и подсушить осадок на воздухе.
11. Растворить осадок в 250 мкл ТЕ-буфера, добавить 1/10 объема ацетата натрия (рН 5,2), добавить 2 объема этанола, инкубировать в холодильнике 20 мин. При этом примеси остаются в растворе, а в осадок снова выпадает ДНК.
12. Отделить осадок центрифугированием в течение 10–15 мин., слить супернатант.
13. Осадок промыть 70 % этанолом, отделить центрифугированием, слить спирт.
14. Осушить осадок 96 % этанолом, отделить центрифугированием ДНК.
15. Растворить ДНК в 100 мкл воды или в ТЕ буфера.

Лабораторная работа 10
**Быстрый метод выделения ДНК
из растительных тканей**
[Великов, с. 11]

Материалы и оборудование: органы растений (или замороженные ткани), микроцентрифуга, морозильник, ступки с пестиками, оксид алюминия, песок.

Растворы:

- 1) буфер для экстракции: трис-НСl (рН 8,0) – 100 мМ, ЭДТА – 50 мМ, NaCl – 500 мМ, SDS – 1,25 %, NaOH – 8,3 мМ, Na₂S₂O₃ – 0,83 %;
- 2) 3 М ацетат калия, рН 5,0. На 100 мл: 5 М ацетат калия – 60 мл; CH₃COOH ледяная – 11,5 мл; H₂O – 28,5 мл;
- 3) смесь фенол–хлороформ (1 : 1);
- 4) смесь хлороформ–изоамиловый спирт (24 : 1).

Ход работы:

1. Взять 200 мг листьев растений, замороженных заранее при –20 °С в морозильнике, либо быстро заморозить навеску в жидком азоте.
2. Образцы растереть в предварительно охлажденной фарфоровой ступке до гомогенного состояния. Если нет жидкого азота, то при растирании к замороженным листьям необходимо добавить 0,1 г оксида алюминия или прокаленного белого речного песка в качестве абразива. В ступку при этом нужно добавить немного буфера для экстракции ДНК (300 мкл).
3. Добавить в ступку 700 мкл буфера для экстракции, снова перемешать.
4. Перенести растертую массу в микропробирку «Эппендорф» так, чтобы объем составлял примерно 700 мкл (на пробирке есть метка 0,75 мл).
5. Перемешать и инкубировать гомогенат при 65 °С в течение 10 мин.

6. Добавить 220 мкл ацетата калия и поместить пробирку на лед на 20 мин.

7. Центрифугировать пробу в течение 3 мин при скорости 10 тыс. об/мин. Перенести супернатант (надосадочную жидкость) в чистую пробирку.

8. К супернатанту добавить равный объем изопропанола, перемешать и центрифугировать 10 мин при 10 тыс. об/мин для осаждения ДНК.

9. Осадок ДНК промыть 70 % этанолом, растворить в 200 мкл буфера TE.

10. Провести процедуру фенольной депротеинизации образца. Для этого внести в пробирку с раствором ДНК равный объем фенол-хлороформной смеси, хорошо перемешать встряхиванием и центрифугировать. Отобрать водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку, не захватывая интерфазу. Повторить ту же процедуру со смесью хлороформ–изоамиловый спирт. Отобрать водную фазу с ДНК в чистую пробирку.

11. Осадить ДНК 2,5 объемами холодного 96 % этанола, предварительно прилив к образцу 1/10 объема 3 М ацетата К (рН 5,0) или Na (рН 5,2).

12. Пробу центрифугировать в течение 10 мин на максимальной скорости. Супернатант слить. Осадок промыть 70 % спиртом.

13. Высушить осадок ДНК на воздухе и растворить в 50 мкл буфера TE.

Лабораторная работа 11

Выделение ДНК растений с использованием СТАВ

Детергент СТАВ (цетилтриэтиламмоний бромид, англ. *cetyl triethylammonium bromide*) хорошо растворяет мембраны клеток. Кроме того, его применение позволяет разделять ДНК и полисахариды, поскольку они отличаются по растворимости в присутствии СТАВ. При высоких концентрациях солей (0,7 М NaCl) нуклеиновые кислоты образуют стабильные, но вместе с тем растворимые

комплексы со СТАВ. При снижении концентрации соли ниже 0,4 М NaCl происходит выпадение в осадок комплексов СТАВ/нуклеиновая кислота, тогда как большая часть полисахаридов остается в растворе. Методики с применением СТАВ позволяют получать препараты растительной ДНК, пригодные для рестрикционного и гибридизационного анализов, для Real-time PCR и ряда других ферментативных реакций.

Материалы и оборудование: растительная ткань, замороженная жидким азотом, свежая или высушенная в гербарии или селикагеле, ступки с пестиками, центрифуга, микроцентрифужные пробирки, вытяжной шкаф, твердотельный термостат («Термит»).

Растворы:

1) лизирующий буфер: СТАВ – 2 %, трис-HCl (pH 8,0) – 100 mM, ЭДТА – 20 mM, NaCl – 1,4 M;

2) буфер для осаждения: СТАВ – 1 %, трис-HCl (pH 8,0) – 50 mM, ЭДТА – 10 mM;

3) высокосолевого ТЕ: трис-HCl (pH 8,0) – 10 mM, ЭДТА – 1 mM, NaCl – 1,2 M;

4) изопропанол;

5) 70 % этиловый спирт;

6) ТЕ: трис-HCl (pH 8,0) – 10 mM, ЭДТА – 1 mM.

Порядок работы:

1. 50–100 мг ткани заморозить в жидком азоте и растереть в ступке с жидким азотом до состояния пудры светло-зеленого цвета. Перенести охлажденным шпателем в пробирки «Эппендорф» объемом 1,5 мл. Добавить 100–200 мкл ТЕ и 400 мкл лизирующего буфера. Инкубировать 10–30 мин при 65 °C (можно 1–3 ч).

2. Охладить до комнатной температуры, добавить 400 мкл хлороформа, смешивать 30 с, центрифугировать 2–5 мин при 12 тыс. об/мин.

3. Отобрать пипеткой верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, в чистую пробирку.

4. Добавить двойной объем буфера для осаждения, перемешать и оставить на столе на 10–60 мин (или ночь).

5. Отделить ДНК в настольной центрифуге 5–10 мин при 12 тыс. об/мин, осторожно вылить супернатант.

6. Осадок ДНК растворить в 100 мкл высокосолевого буфера ТЕ. (Если требуется очистка от РНК, то добавить рибонуклеазу А до концентрации 0,2 мг/мл и инкубировать при 37 °С в течение 10–30 мин, затем провести очистку хлороформом: добавить 200 мкл хлороформа, смешивать 30 с, центрифугировать в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин и отобрать водную фазу в чистую пробирку.)

7. Осадить ДНК 0,8–1 объемом изопропанола (или 2,5–3 объемами этилового спирта); центрифугировать в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин.

8. Осадок ДНК промыть 2–3 раза 75 % спиртом, высушить и растворить в 50 мкл воды или ТЕ.

Лабораторная работа 12

Дополнительная очистка ДНК

Дополнительную очистку ДНК применяют при неудовлетворительных результатах первой очистки (получение серого или желтого осадка в пробирке вместо белого после промывки этанолом, наличие примеси РНК и белков).

1. Добавить 1 мкл РНКазы. Встряхнуть пробирки.
2. Поместить в термостат на 30 мин при 37 °С.
3. Добавить 20 мкл 3 М раствора ацетата натрия и 100 мкл хлороформа.
4. Перемешать и процентрифугировать 10 мин при 13 тыс. об/мин.
5. Водную фазу поместить в чистую пробирку и добавить 200 мкл изопропанола.
6. Поместить в холодильник на время от 40 мин до нескольких часов.
7. Центрифугировать 10 мин при 13 тыс. об/мин.
8. Слить изопропанол и добавить 200 мкл 70 % этанола, после чего встряхнуть, центрифугировать 1–2 мин при 13 тыс. об/мин и слить этанол.

9. Подсушить и растворить в 200 мкл буфера ТЕ.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем сложности выделения ДНК из растительного материала?
2. С какой целью при выделении ДНК проводится обработка фенолом и хлороформом?
3. Почему предпочтительнее использовать додецилсульфат натрия, а не Тритон X-100 при выделении ДНК?
4. Что необходимо сделать, если при осаждении ДНК препарат имеет желтый или коричневый цвет?
5. Как осадить ДНК из раствора?
6. Для чего при выделении ДНК в буфер добавляют меркаптоэтанол и поливинилпирролидон?
7. Почему нежелательно растворять препарат ДНК в дистиллированной воде?
8. Как очистить препарат ДНК от примеси РНК и белков?
9. Какие способы существуют для разрушения клеточной стенки растений?
10. Что такое СТАВ и для чего его применяют?

3. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ПРЕПАРАТОВ ДНК И РНК

Довольно часто количественную и качественную оценку препарату выделенной ДНК в первом приближении дают при гелелектрофорезе, следующем, как правило, сразу за процедурой выделения. Для этого визуально сравнивают на соседних дорожках геля интенсивность свечения в ультрафиолете полученного образца с образцом известной концентрации.

Определить концентрацию ДНК, а также степень ее чистоты можно с помощью спектрофотометра, что точнее и быстрее. Для этого измеряют оптическую плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм. Одна (каждая) оптическая единица соответствует концентрации ДНК в 50 мкг/мл. Для расчета можно воспользоваться калькулятором на интернет-ресурсе MOLBIOL.RU [<http://www.molbiol.ru>] или других подобных порталах.

Спектрофотометрия (абсорбционная) – физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм), видимой (400–760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра. Основная зависимость, изучаемая в спектрофотометрии, – зависимость интенсивности поглощения падающего света от длины волны (λ). В соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества. Нуклеиновые кислоты поглощают ультрафиолетовое (УФ) излучение в области 240–290 нм с максимумом при 260 нм. Хромофорами служат азотистые основания нуклеиновой кислоты (НК), особенно пиримидиновые. Пиримидины поглощают УФ-свет примерно в 10–20 раз интенсивнее, чем хромофоры белковых молекул – триптофан, тирозин и фенилаланин.

Для оценки чистоты препарата ДНК, свободного от РНК, проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн

260, 280 и 235 нм, т. е. на максимумах поглощения растворов ДНК, белков и полисахаридов соответственно. Значение соотношения $A_{260}/280$ для чистой ДНК должно быть больше, чем 1,8, значение $A_{260}/235$ – больше, чем 2,2. Загрязнение полисахаридами характерно главным образом для препаратов растительной ДНК.

Лабораторная работа 13

Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК

Нижний предел концентрации ДНК, которую можно определить спектрофотометрически, составляет 0,1 мкг/мл. На определение обычно берут аликвоту исследуемого раствора ДНК, к примеру, 1 мкл, и разбавляют в 100 и более раз.

Затем пересчитывают полученное значение концентрации раствора. Важно, чтобы в разведенном образце было более 10 нг ДНК. Для сравнения, при гель-электрофорезе также можно визуализировать полосу, содержащую от 10 нг ДНК. В образце ДНК не должно быть РНК.

Оборудование: спектрофотометр, кварцевая кювета, образец ДНК.

Ход работы:

1. Взять микропипеткой 1 мкл образца полученной ДНК и разбавить препарат, добавив 130 мкл буфера TE, содержащего 100 mM NaCl (см. прим. 1). Объем образца делают равным 130 мкл, чтобы кривизна поверхности жидкости не влияла на измерения.

2. Поместить образец разбавленной ДНК в кварцевую кювету.

3. Измерить поглощение A_{260} . Полученное значение должно лежать в пределах 0,005–2,5 (см. прим. 2). В противном случае нужно разбавлять или концентрировать ДНК (см. прим. 3).

4. Рассчитать концентрацию ДНК, используя коэффициент пересчета из таблицы, по формуле: c , мкг/мл = $A_{260} \times K$.

5. Измерить поглощение A_{280} и A_{235} , чтобы оценить степень очистки ДНК от примеси белков и полисахаридов. Отношение

Коэффициенты для расчета концентрации ДНК

Кислота	Коэффициент для исследуемого неразведенного образца, мкг/мл	Коэффициент (1/130) для разведенного образца, мкг/мкл
ДНК (двущепочечная)	50	6,5
ДНК (однощепочечная)	37	4,81
РНК	40	5,2

260/280, так же как и 260/235, должно быть больше, чем 1,8. Для чистой ДНК характерны значения $A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9$ и $A_{260}/A_{235} = 2,2-2,5$, для чистой РНК – значение $A_{260}/A_{280} = 1,9-2,0$ (см. прим. 4).

6. Откройте главную страницу сайта MOLBIOL.RU [<http://www.molbiol.ru>], найдите раздел «Расчеты», выберите пункт «Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК (РНК)» и рассчитайте концентрацию вашего образца с помощью специальной формы.

Примечания:

1. Для растворения ДНК (РНК) можно использовать другие низкосольные буферы, но только не воду. К примеру, растворы 100 мМ NaCl, 20 мМ Na_3PO_4 , 10–100 мМ трис-HCl (pH 7,5–9,0) или 100 мМ K_2HPO_4 (pH 8,2) дают сходные результаты. Измерения в воде приводят к существенным отклонениям. Ошибка измерения может составлять до 14 %, и отношение A_{260}/A_{280} оказывается заниженным.

2. Точность измерения падает при слишком больших и слишком малых значениях A_{260} из-за нарушений закона светопоглощения. Ошибка при значении 0,05 составляет ≈ 18 %, при значении 0,1–1,0 ≈ 1 %. Измерения при значениях свыше 2,5 недостоверны.

3. Концентрируют ДНК путем ее переосаждения спиртом.

4. Для олигонуклеотидов, поглощение которых ощутимо зависит от их состава, существуют специальные расчеты.

5. Эти значения достоверны, если измерение проводится в буферном растворе (например, TE) при нейтральном значении pH.

Лабораторная работа 14

Определение концентрации нуклеиновых кислот микрометодом

В практической деятельности бывает необходимо производить определение концентрации и качества выделения нуклеиновых кислот сразу в большом числе образцов за короткий промежуток времени. С помощью описанной выше методики макроанализа одновременно можно анализировать не более 3–4 образцов, при этом значительное время тратится на приготовление разведений НК, что является источником дополнительных погрешностей. Для преодоления возникших сложностей применяют микропланшетные спектрофотометры. Ниже приведен пример работы на планшетном спектрофотометре-ридере Infini M200 pro (Tecan) с использованием специального микропланшета Nano Quant plate. Данный прибор позволяет проводить одновременный анализ 16 образцов, используя всего 2 мкл неразбавленного раствора нуклеиновых кислот.

Материалы и оборудование: планшетный спектрофотометр Infini M200 pro (Tecan), подключенный к компьютеру, планшет Nano Quant, вата, автоматическая пипетка (сэмплер) переменного объема на 1–10 мкл, желтые наконечники в штативе.

Реактивы: буфер TE, этанол, дистиллированная вода.

Ход работы:

1. Включите персональный компьютер и спектрофотометр. Кнопка включения прибора находится на задней стенке. Когда прибор включен, на его верхней панели в правом нижнем углу горит зеленый индикатор.

2. Запустите программу «I-control 1–10». Когда программа загрузится, зайдите на панели управления на вкладку «Instrument», нажмите кнопку «Connect» и выберите в появившемся окне установленную модель прибора. Нажмите «OK». Теперь прибор готов к работе.

3. В открывшемся диалоговом окне, в нижнем левом углу выберите закладку «Applications». У вас автоматически выбрана про-

грамма для определения качества и количества нуклеиновых кислот с использованием планшета Nano Quant.

4. В выпадающем меню «Type» выберете тип образца, который вы анализируете: деспирализованная геномная ДНК (dsDNA), РНК (RNA), суперспириализованная плазмидная ДНК (ssDNA).

5. Проведите калибровку прибора. Для этого возьмите планшет, снимите крышку. Нанесите на каждую из лунок по 2 мкл буфера TE и накройте планшет крышкой. Поставьте планшет в прибор, нажав на зеленую кнопку на верхней поверхности спектрофотометра. Когда планшет установлен в прибор, в диалоговом окне нажмите кнопку «Start Blanking». После завершения калибровки в верхней части диалогового окна кнопка «Start» начнет подсвечиваться зеленым цветом.

6. Подготовьте планшет к измерению. Для этого откройте его, сотрите сухим ватным тампоном калибровочный буфер, удалите остатки буфера, протерев планшет изнутри тампоном, смоченным в воде, а после – тампоном, смоченным в этаноле. Дайте испариться этанолу.

7. Нанесите образцы для анализа. Вносите по 2 мкл в лунку, используя новый наконечник для каждого образца. После внесения образцов поместите планшет в прибор, нажмите в диалоговом окне кнопку «Start». Через несколько минут измерение будет закончено, после чего автоматически откроется электронная таблица, в которой будут указаны: номер лунки, концентрация нуклеиновых кислот в данной лунке (в нГ/мкл, что соответствует мкг/мл), соотношение оптических плотностей при длине волны 260 нм и 280 нм. Это показатель качества и чистоты выделения ДНК. Он должен быть больше, чем 1,8.

8. Очистите планшет от образцов ДНК с помощью ватного тампона, воды и этанола, как указано в пункте 6, и уберите его в футляр.

9. Сохраните результаты на флеш-карте, закройте программу, отключите прибор и компьютер.

Вопросы для самоконтроля

1. Каким образом можно оценить качество и количество выделенной из образца ДНК?
2. При каких длинах волн поглощают излучение ДНК, РНК, белки и углеводы?
3. Что такое спектрофотометрия?
4. Из какого материала должна быть изготовлена кювета, используемая для определения качества и количества нуклеиновых кислот?
5. Какие соотношения оптических плотностей при длине волны 260 нм и 280 нм имеет препарат качественно выделенной и свободной от примесей ДНК?
6. Каковы пределы обнаружения ДНК в агарозном геле после электрофореза?

4. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

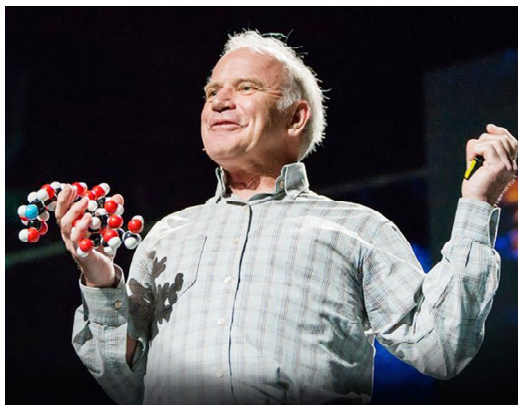
4.1. Суть метода ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод молекулярной биологии, позволяющий значительно увеличить концентрацию определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

Кроме амплификации ДНК, ПЦР позволяет проводить ряд других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов.

В основе метода ПЦР лежит способность хорошо известных в молекулярной биологии ферментов, ДНК-полимераз, осуществлять направленный синтез второй – комплементарной цепи ДНК по имеющейся матрице одноцепочечной ДНК, наращивая небольшую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы, до размеров в несколько тысяч или даже десятков тысяч звеньев. Повышая температуру, можно добиться останова реакции и последующей денатурации полученной ДНК, т. е. разделения цепей полученной в ходе реакции двуцепочечной ДНК. Если в реакционной смеси присутствует избыток праймера, то значительно снизив температуру, чтобы праймер мог вновь связаться с тем же самым комплементарным участком ДНК, и добавив новую порцию фермента, можно вновь установить температуру, необходимую для реакции полимеризации, и таким образом, проведя реакцию еще раз, увеличить количество ранее полученного продукта. Многократное, или циклическое, повторение этой процедуры позволяет наработать значительное количество копий участка ДНК, начинающегося с данного праймера. Принципы метода были впервые предложены профессором Г. Корана в 1971 г. Сам метод ПЦР был разработан К. Мюллисом в 1983 г. (рис. 4.1).

Рис. 4.1. Американский биохимик К. Мюллис – нобелевский лауреат 1993 г. в области химии (совместно с М. Смитом) за изобретение полимеразной цепной реакции



Собственно как метод ПЦР возникла, когда в описанном выше процессе стали использовать не просто ДНК-полимеразу, а так называемую термостабильную ДНК-полимеразу. В начале использования метода после каждого цикла нагревания–охлаждения приходилось добавлять в реакцию смесь ДНК-полимеразу, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре. Процедура была неэффективной, требовала много времени и фермента. Затем метод существенно модифицировали за счет использования ДНК-полимеразы из термофильных бактерий. Эти организмы в ходе эволюции приспособились к жизни в горячей воде, и их ферменты наиболее эффективно функционируют при температуре выше 70 °С.

Это позволило проводить реакцию копирования ДНК без добавления свежей порции фермента после каждого цикла и использовать для работы специальные приборы-термостаты с меняющимися температурно-временными режимами – термоциклеры или амплификаторы ДНК.

Принципы ПЦР с термостабильными полимеразными были изложены в 1988 г. компанией Cetus Corporation [Saiki et al., p. 488]). Метод сделал доступными исследования клеточных и молекулярных процессов для тех, кто не работает в области молекулярной биологии. Внедрение его позволило ускорить реализацию программы «Геном человека», а также способствовало внедрению в практику

клинической диагностики наследственных и инфекционных заболеваний высокоэффективных тестов нового поколения.

Метод ПЦР основан на многократном избирательном копировании определенного участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3 тыс. пар оснований (3 kbp). С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определенных условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20–40 тыс. пар нуклеотидов. Реакция ПЦР проводится в программируемом термостате (амплификаторе) – приборе, в котором происходит достаточно быстро охлаждение и нагревание пробирок (обычно с точностью не менее 0,1 °C). Амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта» и последующего хранения. Для ПЦР в режиме реального времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшетов, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимы следующие компоненты (рис. 4.2):

1) праймер («прямой» и «обратный») – это короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК-или РНК-мишени, служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы. Затравка необходима ДНК-полимеразам для начала синтеза новой цепи, с 3'-конца (гидроксильной группы) праймера (рис. 4.3). Праймеры имеют, как правило, размер от 15 до 30 пар нуклеотидов (п. н.) и комплементарны соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность

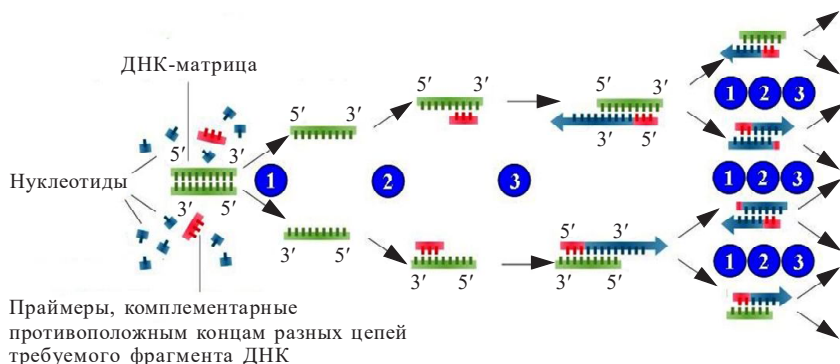


Рис. 4.2. Исходные компоненты ПЦР-смеси

[Лекции по биологии, с. 70]:

1 – денатурация при 94–95 °С; 2 – отжиг при ~68 °С; 3 – элонгация при 72 °С

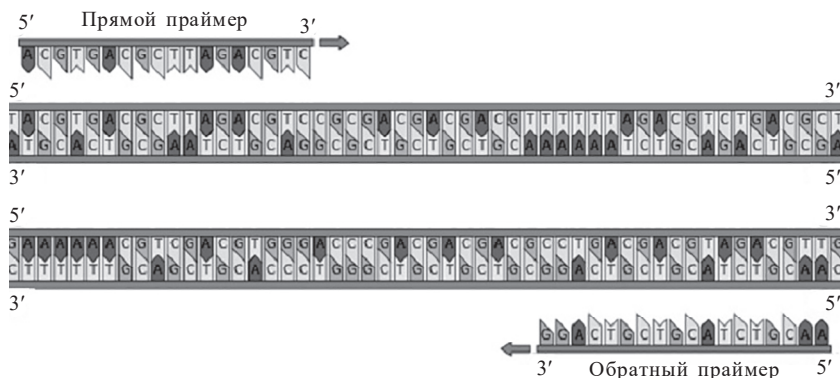


Рис. 4.3. Пример «прямого» и «обратного» праймеров

[Bioinformatics center...]

тест-системы. В случае неверного выбора длины и нуклеотидного состава праймера или температуры отжига возможно образование частично комплементарных комплексов с другими участками матричной ДНК, что может привести к появлению неспецифических продуктов. Верхний предел температуры плавления ограничен оптимумом температуры действия полимеразы, активность которой падает при температурах выше 80 °С. При выборе

праймеров желательно придерживаться следующих критериев: GC-состав 40–60 %; близкие T_m праймеров (отличия не более чем на 5 °C); отсутствие неспецифических вторичных структур – шпильки и димеров; желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной. Оптимальные концентрации праймеров подбираются эмпирически. В однократной реакционной смеси концентрация праймера обыкновенно варьируется в пределах 0,2–0,5 мкМ. Рекомендуется использовать праймеры с чистотой не менее 95 %;

2) термоустойчивая ДНК-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов, – *Thermus aquaticus* (*Taq*-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-полимераза), *Pyrococcus woesei* (*Pwo*-полимераза) и др. Одной из первых термостабильных ДНК-полимераз была *Taq*-полимераза (особенность *Taq*-полимеразы в том, что в конце синтеза она присоединяет к 3'-концу синтезируемой цепи лишний аденин-нуклеотид). Недостаток этой полимеразы заключается в том, что вероятность внесения ошибочного нуклеотида у нее достаточно высока, так как у этого фермента отсутствуют механизмы исправления ошибок (3'→5' экзонуклеазная активность). Сейчас применяют смеси различных термостабильных полимераз, чтобы добиться одновременно высокой скорости полимеризации и высокой точности копирования. Например, полимеразы *Pfu* и *Pwo*, выделенные из архей, обладают 3'→5' экзонуклеазной активностью, их использование значительно уменьшает число мутаций в ДНК, но скорость их работы ниже, чем у *Taq*;

3) смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ): дезоксиденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксцитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый термостабильной полимеразой для синтеза второй цепи ДНК. Конечная концентрация каждого дНТФ, как правило, 0,25 мМ;

4) 10 мМ трис-НСl буферный раствор, рН 8–9 (обычно прилагается к любому коммерческому препарату ДНК-полимеразы и оптимизирован для нее). Высокое значение рН нужно из-за того, что при повышении температуры рН трис-буфера падает и при 72 °С составляет ~7,5. В состав буферного раствора для ДНК-полимеразы входят соли KCl, NaCl для обеспечения необходимой ионной силы раствора; неионный детергент Tween-20 для предотвращения адсорбции молекул ДНК-полимеразы на стенках реакционной посуды (микроцентрифужные пробирки); иногда дополнительно используют бычий сывороточный альбумин (БСА), ди- и олигосахариды для стабилизации ДНК-полимеразы, формамид (для повышения специфичности гибридизации праймеров с ДНК-матрицей) и др.;

5) катионы Mg^{2+} как необходимый кофактор ДНК-полимеразы (используют раствор $MgCl_2$ в конечной концентрации 1,5–3 мМ, оптимальную концентрацию подбирают экспериментально в соответствии с применяемым типом ДНК-полимеразы и числом одновременно амплифицируемых продуктов). Увеличение концентрации Mg^{2+} оказывает очень резкое влияние на специфичность и эффективность ПЦР: увеличивается выход, но уменьшается специфичность. Оптимум зависит от последовательностей матрицы и праймеров;

6) анализируемый образец (ДНК-матрица). Степень очистки ДНК-матрицы не существенна для многих простых приложений ПЦР. Однако для амплификации длинных фрагментов ДНК – более 3 тыс. пар оснований (далее – т. п. о.) нужны высокоочищенные ДНК-матрицы.

Некоторые вещества (ионные детергенты, фенол, этанол, некоторые реагенты для ДНК-мечения), используемые в различных методиках для выделения ДНК, даже в небольших количествах могут ингибировать ПЦР.

Целостность ДНК-матрицы важна при амплификации длинных фрагментов. Матрица, используемая для получения протяженных ампликонов (5 т. п. о и более), требует высокой степени очистки от ДНК. Оптимальной является матрица, хранившаяся не более 1 месяца при температуре +4 °С без заморозки. Не рекомендуется многократно замораживать и размораживать матрицу во избежание ее деградации. При очистке ДНК-матрицы из агарозного геля

избегайте долгой УФ-экспозиции, так как ультрафиолетовое облучение приводит к повреждению ДНК.

Для амплификации коротких участков геномной ДНК лучше использовать фрагментированную матрицу. Фрагменты длиной 200–1000 п. о. можно получить путем обработки ДНК ультразвуком или рестриктазами.

Оптимальная концентрация матрицы в реакции зависит от источника ДНК, степени ее очистки и длины ампликона. Для амплификации длинных фрагментов требуется больше матрицы, однако слишком высокая концентрация ДНК-матрицы в реакционной смеси может ингибировать ПЦР и приводить к неспецифической амплификации.

Цикл ПЦР (амплификация) включает три стадии: денатурацию, отжиг и элонгацию (рис. 4.4).

1. Денатурация – расплетение двойной спирали и расхождение полинуклеотидных цепей. Для этого реакционную смесь нагревают до 94–96 °С, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. Предварительный прогрев в течение 2–3 мин рекомендуется для денатурации геномной или плазмидной ДНК. В остальных случаях рекомендуется использовать как можно более короткую стадию денатурации. Оптимальная продолжительность денатурации для фрагментов менее 3–5 т. п. о. – 15–20 с, более 5 т. п. о. – до 1 мин.

2. Отжиг – гибридизация праймеров и одноцепочечной ДНК-мишени с образованием двухцепочечных комплексов «праймер–матрица», необходимых для инициации синтеза ДНК из мономеров – дезоксирибонуклеотидтрифосфатов. Праймеры подбирают так, что они ограничивают (фланкируют) искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК.

Температура отжига (T_a) – это температура, при которой вероятность связывания праймера с ДНК-матрицей превосходит 70 %. Для пары праймеров она на 4–5 °С (по некоторым источникам – на 2–4 °С и даже 1–2 °С) ниже температуры плавления (T_m) – температуры, при которой число связанных с ДНК и свободных олигонуклеотидов одинаково. Оптимальная температура отжига должна находиться в пределах 50–65 °С (от 55 до 72 °С).

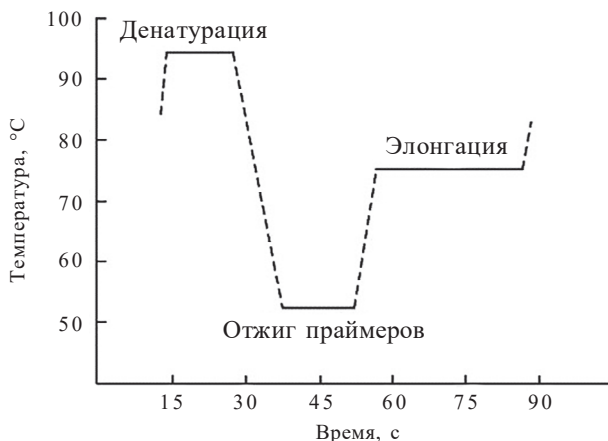


Рис. 4.4. График изменения температуры в пробирке в течение одного цикла полимеразной цепной реакции [Учебно-методическое пособие..., с. 29]

Рассчитать температуру плавления для подобранных праймеров (°C) можно по формулам:

$$T_m = 2(AT) + 4(ГЦ) - \text{для праймеров до } 20 \text{ н;}$$

$$T_m = 69,3 + 0,41(\% GC) - 650/l - \text{для праймеров более } 20 \text{ н,}$$

где l — длина праймера.

Однако оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев повышение температуры отжига на 3–5 градусов позволяет повысить специфичность реакции.

Использование праймеров с низкой температурой отжига может существенно увеличить количество неспецифических продуктов ПЦР. Разница в температуре отжига в паре праймеров не должна превышать 5–6 градусов.

Можно легко подобрать оптимальную температуру отжига, используя градиентный термоамплификатор. Для достижения высокой специфичности ПЦР рекомендуется использовать праймеры с высокой температурой отжига (например, 65–68 °C).

После отжига праймеров *Taq*-полимераза начинает дотраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.

3. Полимеризация (элонгация цепи) – достраивание комплементарных цепей ДНК полимеразой в направлении $3' \rightarrow 5'$, начиная от $3'$ -ОН концов присоединенных праймеров, т. е. матричный синтез ДНК. Элонгация в большинстве случаев происходит при температуре 72°C . Время элонгации зависит от длины ДНК-матрицы (1 мин на каждые 1–1,5 т. п. о.). Для увеличения выхода ПЦР-продукта используйте финальную элонгацию на последнем цикле ПЦР в течение 2–3 мин.

Каждая из этих стадий повторяется 25–40 раз, образуя циклы ПЦР. То есть ПЦР имеет циклический характер. В первом и частично во втором циклах образуются копии (ампликоны), не соответствующие границам амплифицируемого гена (все ампликоны в первом цикле и часть ампликонов во втором цикле получаются более протяженными в тех участках, где еще не произошло связывание второго праймера, ограничивающего рост цепи). Начиная с третьего цикла длина ампликонов становится стандартной, т. е. соответствует числу пар нуклеотидов ДНК-матрицы между $3'$ -концами праймеров. Ампликоны накапливаются в геометрической прогрессии. Процесс имеет цепной характер, так как синтезированные ампликоны в дальнейшем сами служат матрицей, на которой идет синтез (рис. 4.5). Количество специфического продукта реакции (ограниченного праймерами) при 100 % эффективности теоретически возрастает в геометрической прогрессии по формуле $P = 2^n$, где P – количество специфического продукта; n – число циклов реакции.

Практически эффективность ПЦР меньше 100 %, поэтому в действительности $P = (1 + E)^n$, где P – количество продукта; E – средняя эффективность цикла; а n – число циклов реакции. Следует заметить, что процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает, что связано с так называемым «эффектом плато».

Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации, когда количество ампликонов достигает 0,3–1 пикомолей. В зави-

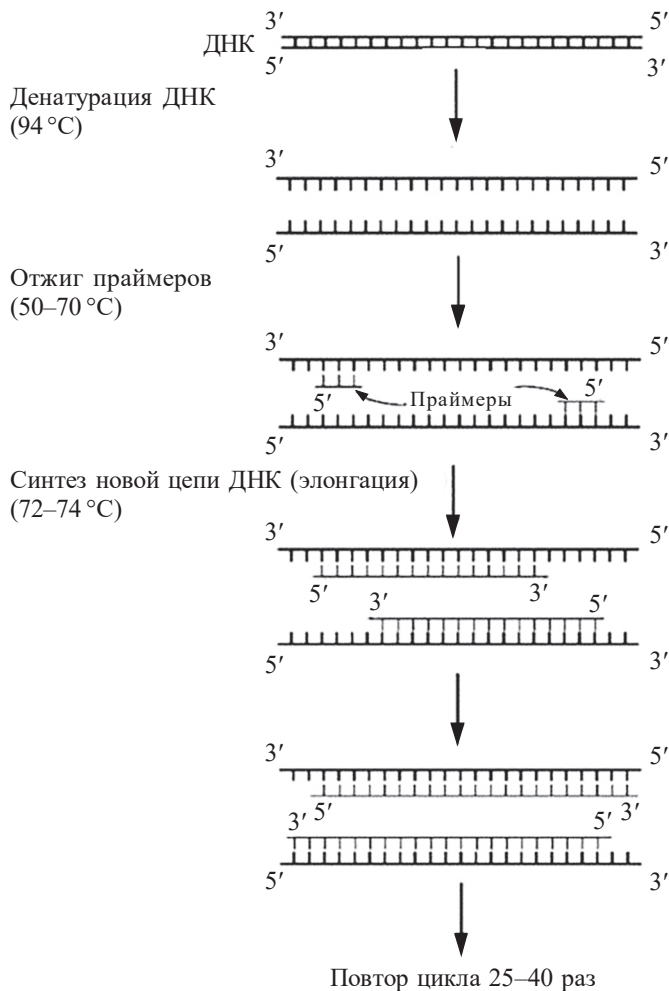


Рис. 4.5. Полимеразная цепная реакция (https://ru.wikipedia.org/wiki/Полимеразная_цепная_реакция, с изм.)

симости от условий и количества циклов реакции амплификации на момент достижения «эффекта плато» влияют:

- утилизация субстратов (дНТФ и праймеров);
- стабильность реагентов (дНТФ и фермента);

- количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы;
- неспецифические продукты или димеры праймеров, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу;
- концентрация специфического продукта и неполная денатурация при высокой концентрации продуктов амплификации.

Подбор и оптимизация праймеров для ПЦР. Праймеры используют, как правило, попарно и подбирают их таким образом, чтобы они были комплементарны противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих выбранную область, и ориентированы 3'-концами в направлении последовательности, которую необходимо амплифицировать, т. е. навстречу друг другу. Оптимизация праймеров для ПЦР сводится к их «дизайну» (выбору нуклеотидной последовательности) и определению оптимальной температуры для их отжига (связывание с ДНК-матрицей). Дизайн праймеров (т. е. выбор определенного участка на ДНК-матрице для связывания с праймером) по известной ДНК-матрице производится в соответствии с рекомендациями, приведенными ниже.

Выбор участка на ДНК-матрице. Это один из самых важных шагов в планировании эксперимента. Необходимо, чтобы пара праймеров эффективно и специфично связывалась с искомой целевой последовательностью. Других вариантов связывания праймеров с ДНК-матрицей быть не должно, по крайней мере для той ДНК, которую необходимо выделить из исследуемого материала.

Информацию о последовательности нуклеотидов целевого фрагмента (или только его концов) можно получить в базе данных международного генбанка (доступна на веб-сайте www.ncbi.nlm.nih.gov). Длина целевого фрагмента должна быть в пределах 100–3000 п. н., нижний предел обусловлен возможностью отделения амплифицированных фрагментов (ампликоны) от димеров праймеров и других неспецифических фрагментов на электрофореze, верхний предел – возможностями *Taq* ДНК-полимеразы, не способной эффективно синтезировать фрагменты большей длины.

Вторичная структура праймеров и целевого фрагмента. Связывание праймеров с матрицей будет затруднено, если в месте

связывания цепь ДНК может образовывать вторичные структуры – гомо-, гетеродимеры и петли. В связи с этим необходимо подбирать праймеры так, чтобы составляющие пару олигонуклеотиды не содержали в своем составе последовательности из 3 и более нуклеотидов подряд, комплементарных аналогичной последовательности этого же (гомодимер) или другого (гетеродимер) праймера, а также палиндромных последовательностей, являющихся причиной образования петель. Заранее предвидеть вторичную структуру целевого фрагмента (ампликон) практически невозможно, поэтому для его эффективной амплификации часто требуется испытать не одну, а две–четыре и более пар праймеров, пока не будет достигнут искомый результат.

Все более широкое использование таких программ, как Oligo, Genrunner, DNA Star и Genefisher, в дизайне праймеров делает выбор условий реакции гораздо более простым. Эти программы позволяют выбирать последовательности, задавать длину праймера, размер продукта, G + C – содержание и т. д., а последующий анализ обеспечивает выбор соответствующих последовательностей праймеров. Без помощи биоинформатики сегодня выбор и дизайн праймеров отнимает неоправданно много времени.

Приготовление реакционной смеси и проведение ПЦР. В последние 10–15 лет для ПЦР широко применяют готовые к употреблению смеси, включающие все необходимые компоненты, кроме праймеров. Для упрощения процедуры приготовления реакционной смеси для ПЦР созданы специальные наборы реагентов для амплификации, включающие все необходимые компоненты, в том числе ДНК-полимеразу, которые уже смешаны в нужных пропорциях. В реакционную смесь для ПЦР требуется добавить лишь ДНК-матрицу и праймеры (в некоторых случаях праймеры также могут входить в состав наборов), что существенно экономит рабочее время и снижает вероятность ошибок и контаминации. Известно, что чувствительность ПЦР может достигать теоретически возможного предела (единичная молекула ДНК-матрицы). Это позволяет выявлять целевой фрагмент, используя микроскопически малые количества исходного материала. Однако у этой полезной

особенности ПЦР есть и обратная сторона – высокая степень опасности получения ложноположительных результатов из-за контаминации, т. е. загрязнения реакционной смеси посторонней ДНК-матрицей или амплифицированными фрагментами (ампликонами). Основные причины получения ложноположительных результатов при постановке ПЦР таковы:

- перекрестная контаминация от пробы к пробе (например, при раскапывании реакционной смеси);

- контаминация рекомбинантными плазмидами, содержащими копии клонированной последовательности целевого фрагмента (эти плазмиды чаще всего используются в качестве положительного контроля ПЦР);

- контаминация ампликонами – наиболее частая причина ложноположительных результатов, так как в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в больших количествах и очень легко переносятся с аэрозолями, через приборы, инструменты, одежду и т. д.

Выполняя основные требования и осуществляя в каждой ПЦР отрицательный контроль разных типов (на процедуру обратной транскрипции, буферный раствор, праймеры), можно практически исключить ложноположительные результаты ПЦР.

Детекция результатов ПЦР. Для анализа ПЦР-амплифицированной ДНК существуют разные методы: гель-электрофорез, дот-блот-гибридизация и блот-гибридизация по Саузерну. С их помощью можно анализировать большинство ПЦР-продуктов, но абсолютно точные результаты получают только при секвенировании.

Присутствие специфического ПЦР-продукта (амплификона) в подавляющем большинстве случаев детектируют электрофоретическим разделением ПЦР-амплификационной смеси на окрашенных бромистым этидием агарозном или полиакриламидном гелях. Для такого выявления необходимо не менее 20 нг ДНК. Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждается ее положением (размерами) по отношению к маркерным фрагментам и ДНК-стандарту. Дополнительные доказательства специфичности амплификона получают путем расщепления специфическими рестриктазными ферментами или путем гибридизации со специ-

фическим радиоактивным или флуоресцентным олигонуклеотидным зондом (см. таблицу).

Некоторые ингибиторы процесса ПЦР

Ингибитор	Концентрация ингибиторов
SDS	> 0,005 %
Фенол	> 0,2 %
Этанол	> 1 %
Изопропанол	> 1 %
Ацетат натрия	> 5 мМ
Хлористый натрий	> 25 мМ
EDTA	> 0,05 мМ
Мочевина	> 20 мМ

Прямое секвенирование амплифицированной ДНК – также высоконадежный метод доказательства ее специфичности, но применяется в основном для определения точечных мутаций генов.

4.2. Модификации метода ПЦР

В настоящее время разработано множество вариантов метода ПЦР. Ниже приведено описание некоторых его модификаций.

Вложенная ПЦР (гнездовая, англ. *nested PCR*). В данной модификации метода ПЦР во втором раунде полимеразной цепной реакции используют две пары праймеров и проводят еще два раунда реакции. В ходе второго раунда праймеры находятся внутри по отношению к использованным в первом раунде, а первый продукт ПЦР используется как новая матрица. Такой тип ПЦР представляет собой мощный инструмент для амплификации небольших количеств ДНК из сложных смесей. Однако если нужная матрица имеет малую концентрацию в смеси ДНК-фрагментов, требуется проводить много циклов амплификации и использовать праймеры, которые

могут связаться с другими локусами. Это зачастую приводит к амплификации посторонних или неверных последовательностей. Использование второго набора праймеров (вложенные праймеры), отжигающихся внутри первого продукта ПЦР, позволяет проводить дальнейшую амплификацию с образованием более короткого продукта, с более высокой чувствительностью и без потерь специфичности. Таким образом, любые нежелательные последовательности ДНК, амплифицированные в ходе первого раунда ПЦР, имеют меньше шансов амплифицироваться во втором раунде.

Случайная полимеразная ПЦР. Модификация ПЦР, которая позволяет осуществить амплификацию случайных последовательностей (с неопределенной структурой) с матрицы, сложных смесей ДНК или целых клеток. Существует несколько вариантов проведения случайной ПЦР: с единственным случайным праймером (происходит линейное накопление продукта) или при нормальных условиях (экспоненциально). Обычный вариант случайной ПЦР – амплификация с праймером, часть которого имеет определенную последовательность, а другая часть – вырожденную. Включение вырожденных районов в последовательность праймера делает возможным его отжиг на множестве сайтов связывания в целевой матрице (или матрицах). Вырожденные праймеры образуют продукты ПЦР с различными длиной и последовательностью, покрывающими значительную часть целевой ДНК. Часто используются для амплификации преобладающей ДНК или вставочных последовательностей, последовательность и длина которых неизвестны. Менее распространенный вариант случайной ПЦР, когда реакцию проводят при низких температурах (например, 30 °C). При этом праймеры отжигаются на матрице неверно, приводя к амплификации продуктов случайной ПЦР.

ПЦР с «горячим» стартом (англ. *hot-start PCR*). Модификация ПЦР, суть которой состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров. Для этого активность полимеразы в момент постановки ПЦР блокируется антителами или имитирующими антитела небольшими молекулами. Первая денатурация обычно проводится при 95 °C в течение 10 мин.

Для предотвращения преждевременного взаимодействия фермента с компонентами реакционной смеси и образования неспецифических продуктов реакции до момента полного прогрева используются легкоплавкий парафин или специальные масла, отделяющие полимеразу от реакционной смеси. В зависимости от ГЦ-состава и размера праймеры имеют определенную температуру плавления, при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает температуру плавления, праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При соблюдении оптимальных условий, т. е. температуры отжига, близкой к температуре плавления, праймер образует двуцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и таким образом обеспечивает специфичность реакции. Даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, в отсутствие фермента элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер–ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации. Таким образом, ПЦР с «горячим» стартом позволяет минимизировать вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР и возможность получения ложноположительных результатов анализа.

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР или РНК-ПЦР). В молекулярной биологии метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (англ. *reverse transcription polymerase chain reaction*) принято обозначать как ОТ-ПЦР. ОТ-ПЦР представляет собой метод амплификации специфического фрагмента рибонуклеиновой кислоты (РНК).

Одноцепочечную молекулу РНК превращают в реакции обратной транскрипции в комплементарную ДНК и далее амплифицируют уже одноцепочечную молекулу ДНК, используя традиционную ПЦР. Для превращения последовательности РНК в комплементарную ДНК используют обратную транскриптазу. Существуют термостабильные обратные транскриптазы (например, обратная

транскриптаза вируса миелобластома птиц), которые могут быть использованы в ПЦР.

На первом этапе комплементарная ДНК образуется на матрице мРНК из dNTP ферментом обратной транскриптазой. Компоненты реакции смешиваются с ДНК-праймером и буфером с обратной транскриптазой на один час при 37 °С. После того как обратная транскрипция закончена и образована ДНК на матрице мРНК, следующие циклы производятся по стандартной методике ПЦР. После 30 циклов амплификации образуются миллионы копий нужной последовательности [Глик, Пестернак, 2002].

ОТ-ПЦР обычно используется при изучении вируса иммунодефицита человека, так как ВИЧ является ретровирусом и содержит РНК. ОТ-ПЦР можно считать чувствительной методикой, с ее помощью может быть обнаружено малое количество молекул РНК. Данный метод ПЦР находит широкое применение в молекулярной биологии и клинических исследованиях, где его можно применять для детектирования инфекционных агентов, генетических маркеров, а также опосредованно для выявления белков в малом количестве.

Метилчувствительная и метилспецифическая ПЦР. Метилчувствительная полимеразная цепная реакция (МЧ-ПЦР) основана на использовании рестрикционных эндонуклеаз, чувствительных и нечувствительных к метилированию остатков цитозина. Для анализа метилирования конкретных специфических последовательностей используют метилчувствительные рестриктазы. Если фрагмент ДНК не содержит модифицированных оснований, то гидролиз проходит полностью, ПЦР не происходит и, соответственно, ее продукт не определяется. В то же время если в сайте узнавания рестриктазы вместо цитозина присутствует метилцитозин, то гидролиз не происходит, и в геле выявляется фрагмент определенной длины. Большим достоинством метода является высокая чувствительность, позволяющая анализировать метилированные аллели в присутствии большого избытка аллелей дикого типа (аналитическая чувствительность: 1 метилированная последовательность на 2000 неметилированных).

Метилспецифическая полимеразная цепная реакция (МС-ПЦР) – метод, позволяющий оценить степень метилирования цетозина. Процедура состоит в предварительной обработке тестируемых образцов ДНК бисульфитом натрия, что при определенных условиях приводит к дезаминированию цитозина с образованием урацила, тогда как метилированные остатки цитозина остаются неизменными. При последующей ПЦР урацил заменяется на тимин. Таким образом, оказывается возможным конструировать праймеры, избирательно амплифицирующие последовательности, содержащие или не содержащие метилированные остатки цитозина. Чувствительность метода: 1 метилированный аллель на 1000 неметилированных (см.: <http://www.findpatent.ru/patent/240/2405837.html>)

ПЦР в реальном времени (англ. *real-time PCR*, *RT-PCR*). В основе метода лежит принцип флуоресцентной детекции продуктов ПЦР непосредственно в ходе амплификации. Детекция продуктов амплификации проводится прямо в реакционной среде через стенки или крышку закрытой пробирки.

1. В состав реакционной смеси наряду с праймерами и остальными компонентами реакции добавляются специальные флуоресцентные метки (зонды). Флуоресцентный зонд представляет собой олигонуклеотид, комплементарный внутренней последовательности амплифицируемого фрагмента ДНК возбудителя. На 3'-конце зонда находится флуоресцентная молекула – флуорофор, а на 5'-конце расположена молекула-«гаситель» флуоресценции. За счет близости флуорофора и гасителя вся энергия, поглощенная флуорофором, переходит на гаситель по принципу флуоресцентно-резонансного переноса энергии. При этом сигнал флуоресценции отсутствует.

2. В ходе ПЦР при повышении температуры происходит денатурация ДНК возбудителя, и зонд наряду с праймерами гибридизуется с комплементарным участком ДНК.

3. В процессе синтеза новой цепи ДНК фермент ДНК-полимераза расщепляет этот зонд. При расщеплении зонда флуорофор отделяется от «гасителя», расстояние между ними увеличивается, процесс тушения флуоресценции становится невозможным. В этот момент можно зарегистрировать флуоресцентный сигнал от флуорофора.

В результате такого принципа неспецифическая амплификация не обнаруживается (см.: http://www.lytech.ru/articles_129.htm).

Существует два основных подхода к детекции результатов ПЦР в реальном времени: с помощью интеркалирующих красителей и на основе флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов. Низкоспецифичная детекция результатов ПЦР-РВ с помощью интеркалирующих красителей возможна за счет увеличения флуоресценции интеркалирующего красителя при образовании комплекса с двуцепочечной ДНК. Самый популярный краситель на сегодняшний день – SYBR Green I. Это чувствительный флуоресцентный индикатор двухцепочечной ДНК. Максимум флуоресценции в комплексе с ДНК составляет 521 нм, максимум возбуждения – 497 нм (второй максимум около 254 нм). Хорошо возбуждается стандартным лазером с длиной волны 488 нм.

Более высокой специфичности детекции результатов ПЦР в режиме реального времени можно достигнуть за счет наличия в реакционной смеси дополнительного олигонуклеотида – гибридационного зонда [Бикбулатова и др., с. 53]. Такой зонд «отжигается» (комплементарно соединяется с ДНК) на участке ампликона между прямым и обратным праймером. На разных концах зонда расположены флуорофор и гаситель флуоресценции этого красителя. Когда флуорофор и гаситель связаны с олигонуклеотидным зондом, наблюдается лишь незначительная флуоресцентная эмиссия. Во время процесса амплификации за счет 5'-экзонуклеазной активности *Taq*-полимеразы флуоресцентная метка переходит в раствор, освобождаясь от соседства с гасителем, и генерирует флуоресцентный сигнал, усиливающийся в реальном времени пропорционально накоплению ампликата. Таким образом, в случае если используемые праймеры «отожгутся» на неспецифических участках с образованием в ходе ПЦР-РВ «нецелевого» продукта, то его последовательность не будет иметь участок, комплементарный гибридационному зонду, и, соответственно, «нецелевые» ампликоны не будут регистрироваться как целевые. При этом для такого варианта ПЦР-РВ можно одновременно использовать несколько видов флуорофоров и гасителей их флуоресценции (с неперекрывающимися

спектрами излучения). Это позволяет осуществлять мультиплексную ПЦР в реальном времени. В ПЦР-РВ используются различные типы флуоресцентных зондов или праймеров, включая TaqMan-зонд, молекулярные маяки и Scorpion-зонд. Каждый из них основан на использовании олигонуклеотида (рис. 4.6).

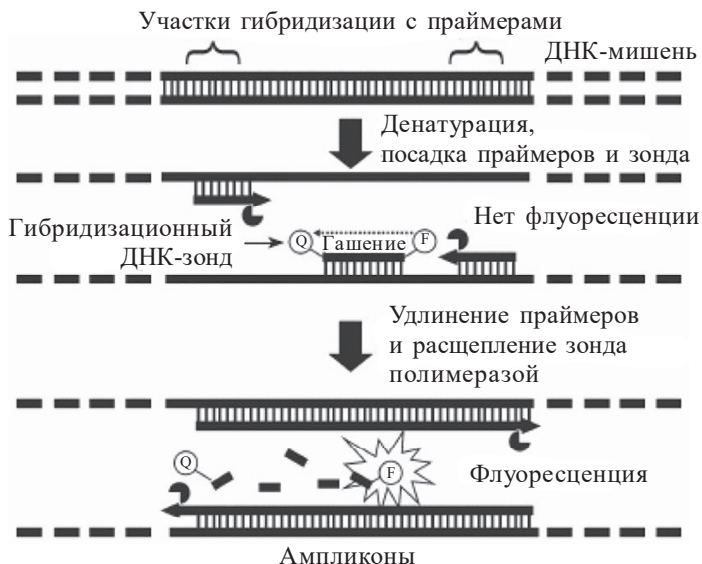


Рис. 4.6. Принцип ПЦР в режиме реального времени:
F – флуорофор; *Q* – гаситель, блокирующий флуоресценцию
 [Учебно-методическое пособие..., с. 46]

Для анализа в режиме «реального времени» используют специальные ДНК-амплификаторы с оптическим блоком, позволяющие детектировать флуоресценцию внутри реакционной пробирки в ходе реакции. При амплификации образца детектируемый флуоресцентный сигнал может состоять из трех последовательных участков: 1 – базовая линия (сигнал не превышает предела детектирования прибора); 2 – экспоненциальная амплификация; 3 – плато. Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастает пропорционально количеству продукта амплификации. Мониторинг сигнала позволяет построить кинетическую кривую реакции, при этом момент заметного увели-

чения сигнала и отрыва его от фонового – так называемый пороговый цикл – зависит от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл. Главным преимуществом детекции результатов ПЦР в режиме «реального времени» является возможность проведения количественного анализа. При количественном исследовании образцов каждая серия экспериментов сопровождается постановкой амплификации с контрольными образцами, в которых заведомо известно количество копий ДНК (калибровочные образцы). Сравнение кинетики накопления продуктов амплификации в экспериментальных и контрольных образцах позволяет оценить концентрацию ДНК в диапазоне разведений контрольных препаратов ДНК. Следует отметить, что для выполнения количественного ПЦР-анализа рекомендуется использование препаратов ДНК с высокой степенью очистки, так как присутствие нежелательных примесей (ингибиторов) снижает эффективность амплификации исследуемой и контрольной ДНК. Для контроля точности количественного анализа используют калиброванные внутренние контроли.

Часто ПЦР в реальном времени комбинируют с ОТ-ПЦР для измерения малых количеств мРНК, что позволяет получать количественную информацию о содержании искомой мРНК в клетке и судить об уровне экспрессии гена в отдельной клетке или ткани. Отличительными чертами ПЦР-РВ являются не только возможность количественного определения ДНК/РНК в исследуемом материале, но и отсутствие стадии электрофореза, что позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов. Также менее строгие требования предъявляются к организации ПЦР-лаборатории, становятся возможны автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

Кроме того, возможны и другие варианты ПЦР, получившие наибольшее распространение в научно-исследовательских лабораториях, например:

– **ПЦР длинных фрагментов** (англ. *long-range PCR*) – вариант ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тыс.

и более оснований). Для реализации данного подхода используют смесь двух полимераз, одна из которых – *Taq*-полимераза с высокой процессивностью (способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНК-полимераза с 3′–5′ экзонуклеазной активностью (*Pfu*-полимераза). Она необходима для корректирования ошибок, внесенных *Taq*-полимеразой, при этом некомплементарные нуклеотиды удаляются с помощью *Pfu*-полимеразы;

– **ступенчатая ПЦР** (англ. *touchdown PCR*) – с помощью этого подхода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров. Первые циклы проводят при температуре выше оптимальной температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру отжига постепенно снижают до оптимальной. Это делается для того, чтобы праймер гибридизовался с комплементарной цепью всей своей длиной; тогда как при оптимальной температуре отжига праймер частично гибридизуется с комплементарной цепью. Частичная гибридизация праймера на геномной ДНК приводит к неспецифической амплификации, если участков связывания для праймера достаточно много. В большинстве случаев первые десять ПЦР-циклов можно проводить при температуре отжига в 72–75 °С, а затем сразу снизить ее до оптимальной, например, до 60–65 °С.

4.3. Преимущества ПЦР перед другими методами

К преимуществам полимеразной цепной реакции можно отнести следующее:

- 1) универсальность: при помощи ПЦР можно определять ДНК в любых биологических образцах;
- 2) метод прямой и позволяет достичь предельно возможной чувствительности;
- 3) специфичность метода приближается к 100 %;
- 4) для ПЦР-анализа пригоден любой материал, в том числе и гистологические препараты;
- 5) метод позволяет определять число копий ДНК в пробе и тем самым наблюдать динамику;

б) метод прост в исполнении, возможна его полная автоматизация;

7) результаты получают через несколько часов, т. е. в течение одного рабочего дня.

4.4. Практическое применение и перспективы развития метода ПЦР

Криминалистика. ПЦР используют для сравнения так называемых «генетических отпечатков пальцев». Для процедуры необходим образец генетического материала с места преступления: кровь, слюна, сперма, волосы и т. п. Его сравнивают с генетическим материалом подозреваемого. Достаточно совсем малого количества ДНК, теоретически – одной копии. ДНК расщепляют на фрагменты, затем амплифицируют с помощью ПЦР. Полученную с помощью электрофореза картину расположения полос ДНК и называют генетическим отпечатком пальцев (англ. *genetic fingerprint*).

Медицинская диагностика. ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику наследственных и вирусных заболеваний. Нужный ген амплифицируют с помощью ПЦР с использованием соответствующих праймеров, а затем секвенируют для определения мутаций. Вирусные инфекции можно обнаруживать сразу после заражения, за недели или месяцы до того, как проявятся симптомы заболевания.

Персонализированная медицина. Иногда лекарства оказываются токсичными или аллергенными для некоторых пациентов. Причины этого заключаются в индивидуальных различиях в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных. Эти различия детерминируются на генетическом уровне. Например, у одного пациента определенный цитохром (белок печени, отвечающий за метаболизм чужеродных веществ) может быть более активен, у другого – менее. Для того чтобы определить, какой разновидностью цитохрома обладает данный пациент, предложено проводить ПЦР-анализ перед применением лекарства.

Клонирование генов. Клонирование генов – это процесс выделения гена и получения большого количества продукта данного

гена в результате генно-инженерных манипуляций. ПЦР используется для того, чтобы амплифицировать ген, который затем вставляется в вектор – фрагмент ДНК, переносящий чужеродный ген в тот же самый или другой, удобный для выращивания организм. Вставку генов в чужеродный организм обычно используют для получения продукта этого гена – РНК или, чаще всего, белка. Таким образом в промышленных количествах получают многие белки для использования в сельском хозяйстве, медицине и др.

Секвенирование. ПЦР является неотъемлемой частью метода секвенирования с использованием меченных флуоресцентной меткой или радиоактивным изотопом дидезоксинуклеотидов, так как именно в ходе полимеризации в цепь ДНК встраиваются производные нуклеотидов, меченные флуоресцентной или радиоактивной меткой. Присоединение дидезоксинуклеотида к синтезируемой цепи приводит к обрыву синтеза, позволяя определить положение специфических нуклеотидов после разделения в геле.

Лабораторная работа 15

Проведение ПЦР-амплификации ДНК с ISSR-праймерами

ПЦР проводится в объеме 10–50 мкл. Рабочая концентрация праймеров в реакционной смеси составляет 0,2–1 пМ/мкл. Количество матричной ДНК, добавляемой в реакцию, колеблется в пределах от 10 нг (плазмидная ДНК) до 1000 нг (геномная ДНК). Рабочая концентрация *Taq*-полимеразы составляет 0,01–0,05 ед/мкл. Число циклов – 30–40 (45). Считается, что скорость достраивания ДНК *Taq*-полимеразой при ПЦР составляет 1000 нуклеотидов в минуту.

Не рекомендуется брать больше чем 50 пМ праймера на пробу, иначе возможен неспецифический отжиг и образование праймер-димеров.

Материал и оборудование: размороженные образцы ДНК, ПЦР-бокс, амплификатор, дозаторы, штативы, пробирки для ПЦР, наконечники.

Реактивы:

1) ПЦР-смесь с буфером: вода деионизованная – 12,2 мкл, окрашенный буфер* – 4 мкл, праймер – 1 мкл, *Taq*-полимеразы – 0,4 мкл, dNTP – 0,4 мкл, матричная ДНК – 2 мкл;

2) ПЦР-смесь ScreenMix (Евроген): вода деионизованная – 13 мкл, смесь для ПЦР ScreenMix (Евроген) – 4 мкл, праймер (10 пМ/мкл) – 1 мкл, ДНК (40 нг/мкл) – 2 мкл;

3) *если буфер не окрашен, краску надо вносить в пробу, наносимую на гель при электрофорезе.

Ход работы:

1. В ПЦР-боксе в пластиковой тонкостенной пробирке на 0,5 (0,2) мл смешать указанные выше компоненты реакционной смеси. Смесь для ПЦР ScreenMix и праймеры размораживать перед самым использованием и быстро убирать в морозильник. При использовании полимеразы ее следует вносить в последний момент, не допуская нагревания.

2. В каждую пробирку внести 2 мкл предварительно размороженной и перемешанной ДНК. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.

3. Поместить пробирки в ДНК-амплификатор.

4. Запустить следующий режим ПЦР: предварительная денатурация матрицы при 94 °С – 5 мин, затем 35 циклов амплификации: 94 °С – 40 с – денатурация; 42–52 °С – 50 с – отжиг праймеров; 72 °С – 40 с – элонгация, полимеризация; затем задать температуру 72 °С – 7 мин (окончательная достройка цепей) и вывести на +5 °С – режим хранения.

5. Температуру отжига праймеров определяют по формулам или (лучше) подбирают экспериментальным путем с помощью программы градиента температур амплификатора.

6. Образцы после ПЦР-реакции можно сразу использовать для детекции результатов с помощью электрофореза или хранить их в морозильнике.

Лабораторная работа 16

Проведение ПЦР-амплификации ДНК с ITS-праймерами

Материал и оборудование: размороженные образцы ДНК, ПЦР-бокс, амплификатор, дозаторы, штативы, пробирки для ПЦР, наконечники.

Реактивы:

- 1) смесь для ПЦР-реакции (25 мкл): деионизированная вода – 17 мкл;
- 2) смесь для ПЦР-реакции ScreenMix (Евроген) – 5 мкл;
- 3) праймеры pr1 F (прямой – TCC GTA GGT GAA CCT GCG) и ITS4 (обратный – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) – по 0,5 мкл каждого, ДНК – 2 мкл.

Ход работы:

1. В ПЦР-боксе в стерильной пластиковой тонкостенной пробирке на 0,2 мл смешать указанные выше компоненты реакционной смеси. Смесь для ПЦР ScreenMix и праймеры размораживать перед самым использованием и быстро убирать в морозильник.
2. В каждую пробирку внести 2 мкл предварительно размороженной и перемешанной ДНК. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
3. Поместить пробирки в ДНК-амплификатор.
4. Запустить следующий режим ПЦР: предварительная денатурация матрицы при 94 °C – 2 мин; затем 35 циклов: 94 °C – 45 с, 56 °C – 45 с, 72 °C – 60 с, затем 72 °C – 10 мин и вывести на +5 °C – режим хранения.
5. Образцы после ПЦР реакции можно сразу использовать для детекции результатов с помощью электрофореза или хранить их в морозильнике.

Лабораторная работа 17

Определение наличия ГМО в продуктах питания

Генная инженерия широко вошла в нашу повседневную жизнь, однако до сих пор не утихают споры относительно безопасности и этичности использования в пищу генетически модифицированных организмов. Поэтому важно надежно детектировать наличие ГМ-компонентов в продуктах питания. Наиболее надежным, быстрым и простым способом является проведение ПЦР.

Гены, вводимые в модифицируемый организм, могут быть разнообразны, поэтому не всегда удобно определять наличие встройки именно целевого компонента. Гораздо более простым вариантом является определение наличия в исследуемом организме универсальных генетических последовательностей – промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35 S) или терминатора из агробактерий (*Nos*).

Оборудование: амплификатор, ПЦР-бокс, вортекс, камера для горизонтального электрофореза, источник тока, трансиллюминатор, гель-документатор.

Реактивы и расходные материалы: *Taq*-полимераза, буфер для полимеразы, смесь дезоксирибонуклеотидов, праймеры к CaMV 35 S промотору (праймер прямой: 5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3'; праймер обратный: 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3'), препараты исследуемой ДНК, ТАЕ-буфер, агароза, штатив «рабочее место», пробирки для проведения ПЦР (0,2 мл или 0,6 мл, в зависимости от марки амплификатора), набор автоматических пипеток, желтые наконечники в штативе.

Ход работы:

1. Из образца исследуемого продукта выделите ДНК одним из описанных способов. Определите качество и концентрацию ДНК.

2. Приготовьте смесь для проведения ПЦР из расчета 20 мкл на один образец, учитывая концентрацию стоковых растворов: буфер – 10х; смесь нуклеотидов – 50х; *Taq*-полимераза – 5 ед/мкл; праймеры – по 10 мкМ.

3. Полученную смесь разлейте по 18 мкл в пробирки для проведения ПЦР. Внесите 2 мкл препарата исследуемой ДНК.

4. Проведите амплификацию по программе: денатурация при 95 °С – 5 мин; 40 циклов амплификации: 95°С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 40 с; конечная элонгация при 72 °С – 5 мин.

5. Проведите электрофорез ПЦР-продуктов в 2 % агарозном геле на ТАЕ-буфере. Искомый ПЦР-продукт – 118 пар оснований.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем суть полимеразной цепной реакции? Какой биологический процесс она повторяет?

2. Кто автор метода ПЦР?

3. Какие этапы можно выделить в ПЦР?

4. Как выглядит стандартная программа для ПЦР, из каких этапов она состоит?

5. Что такое праймер?

6. Почему в буфер для ПЦР обязательно должны входить ионы магния?

7. Назовите области применения ПЦР.

8. Что такое ПЦР в реальном времени, какие преимущества у этого метода в сравнении с классическим?

9. Какие разновидности ПЦР вам известны?

10. Что такое контаминация? Каковы ее причины и как с ней бороться?

11. Как рассчитать температуру отжига праймеров?

12. Что такое дизайн праймеров? Каким требованиям должны удовлетворять праймеры?

5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Разделение нуклеиновых кислот основано на том, что смесь их макромолекул в определенных средах под действием электрического поля делится на ряд фракций (рис. 5.1) в зависимости от размера фрагмента и конформационной структуры (кольцевая форма, линейная и др.). С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например, центрифугированием в градиенте плотности.

Следует отметить, что наиболее распространенным методом является гель-электрофорез, т. е. фракционирование в специальных гелевых пластинах или блоках. В качестве поддерживающих носителей наиболее часто применяют агарозу и полиакриламид.

Размер молекул ДНК. Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле предположительно одним концом вперед со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс.

Концентрация геля. Фрагменты ДНК определенного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации носителя (агароза, полиакриламид), с разными скоростями. Существует прямая зависимость между логарифмом электрофоретической подвижности ДНК и концентрацией геля. Подвижность макромолекул в полиакриламидном геле обратно пропорциональна среднему размеру пор.

Конформация ДНК. Молекулы ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например, кольцевую и линейную, движутся с разными скоростями.

Напряженность электрического поля. При низких напряжениях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает.

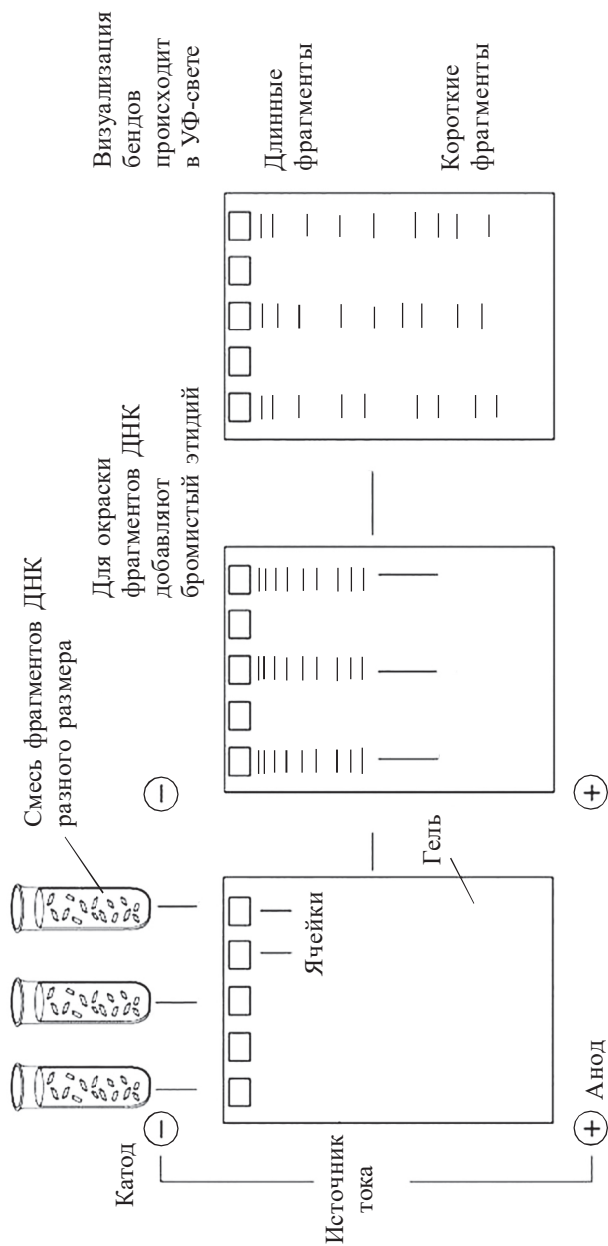


Рис. 5.1. Схема электрофореза ДНК в агарозном геле

Таким образом, с увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в геле снижается. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей 5 В/см.

Состав оснований и температура. Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях, в отличие от поведения в полиакриламидных гелях, слабо зависит от состава оснований ДНК или температуры геля. В агарозных гелях в области температур от 4 до 30 °С изменений относительной электрофоретической подвижности фрагментов ДНК разного размера не наблюдается.

Электрофоретическое разделение проводят в вертикальных или горизонтальных электрофоретических камерах (рис. 5.2). Для агарозных гелей чаще применяются горизонтальные камеры, а для полиакриламидных гелей – как горизонтальные, так и вертикальные типы камер.

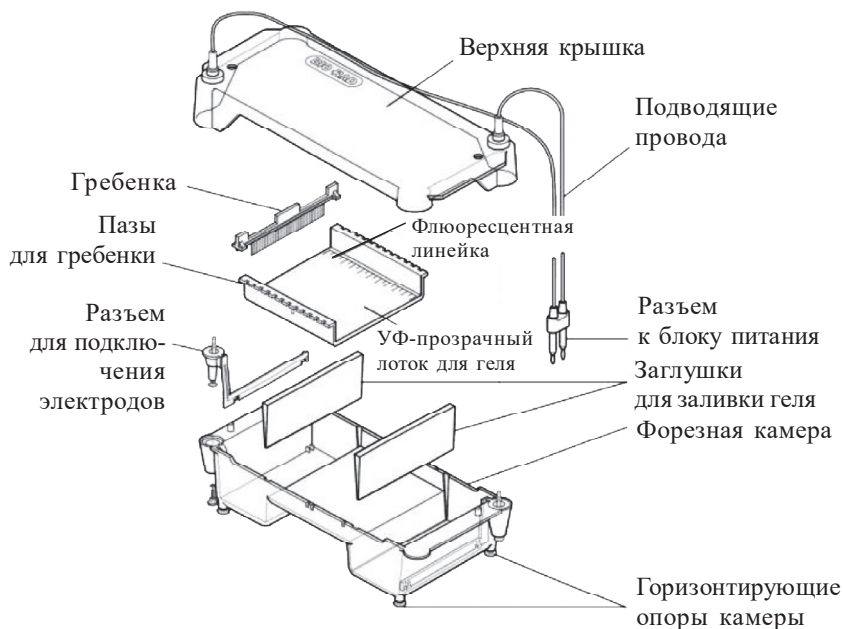


Рис. 5.2. Основные элементы установки для проведения горизонтального электрофореза в агарозном геле [Учебно-методическое пособие..., с. 86]

После электрофоретического фракционирования гель кладут в кювету, где и производят окрашивание. Для флюоресцирующего окрашивания применяют раствор бромистого этидия (после окраски гель просматривают под ультрафиолетовым светом), а для анализа в спектре видимого света используют окрашивающую смесь, содержащую нитрат серебра.

Минимальное количество ДНК, которое можно обнаружить при фотографировании геля, окрашенного бромистым этидием, составляет 2 нг при ширине полосы 0,5 см. Максимальное количество ДНК, которое можно внести в лунку, зависит от числа фрагментов в пробе и их размеров. Если лунка будет переполнена (в полосе указанной ширины будет содержаться более 200 нг ДНК), то полоса окажется расплывчатой и будет иметь шлейф. Этот дефект особенно выражен при разделении крупных фрагментов. При анализе простого набора молекул ДНК вносят 0,20,5 мкг ДНК. Если же пробы содержат очень большое число фрагментов ДНК разных размеров (например, рестрикты), то можно наносить по 5–10 мкг в лунку, не опасаясь существенного снижения разрешающей способности электрофореза.

После окраски проводят фотодокументирование гелей для сохранения результатов, а также их последующей интерпретации.

Заключительным этапом электрофоретического анализа является описание спектров – определение количества зон и их обозначение. Для типировки каждой фракции используется числовая величина размера (в парах нуклеотидов) фрагментов ДНК, находящихся в данной электрофоретической фракции. Вычисление размера молекул ДНК каждой зоны спектра производится на основании сравнения электрофоретической подвижности данной зоны относительно молекул ДНК с известным размером, так называемым электрофоретическим маркером. Маркер может представлять собой смесь однотипных или различающихся по размерам молекул ДНК. Однако следует подчеркнуть еще раз, что для каждой фракции маркера известен размер молекул ДНК, которые их составляют. В качестве маркера могут быть использованы рестрикционные фрагменты бактериофагов, искусственно синтезированные цепочки ДНК, ПЦР-продукты с известным размером и др.

Анализ и расчет размера фрагментов проводят с помощью специального программного обеспечения.

Лабораторная работа 18

Электрофорез в 6 % полиакриламидном денатурирующем геле и процедура окраски полиакриламидных гелей нитратом серебра

Материалы и оборудование: вертикальная камера для электрофореза, источник тока, шейкер-качалка, ванна для инкубации и окрашивания гелей, амплифицированные образцы, дозаторы.

Реактивы:

1) состав 6 % денатурирующего акриламидного геля: акриламид – 5,7 г, бис-акриламид – 0,3 г, 5х трис-ЭДТА-боратный буфер – 20 мл, мочевины (карбамид) – 42 г. Довести объем раствора дистиллированной водой до 100 мл. Перемешать, профильтровать, деаэрировать, затем добавить (непосредственно перед использованием) персульфат аммония (10 % раствор) – 1 мл и тетраметиленамин (TEMED) – 60 мкл;

2) состав формамидного LD-красителя для нанесения проб на денатурирующий полиакриламидный гель: ксиленианол – 10 мг, бромфеноловый синий – 10 мг;

3) ЭДТА (0,5 М) – 200 мкл;

4) формамид – 100 мл;

5) состав 10х трис-ЭДТА-боратного (ТВЕ) буфера (рН 8,3): трис – 107,8 г, борная кислота – 55,0 г, ЭДТА (натриевая соль) – 7,4 г, дистиллированная вода – 1000 мл.

Примечание. При приготовлении 5х трис-ЭДТА-боратного буфера объем дистиллированной воды составляет 200 мл.

Ход работы:

1. Положить большое стекло на резиновые подставки гладкой стороной вверх.

2. Полностью сухое малое стекло под тягой обработать следующим составом: 200 мкл ледяной уксусной кислоты; 1,0 мл этанола;

1 мкл bindsilane (перед использованием перемешать). Раствор залить в середину стекла и растереть безворсовой бумажной салфеткой. Оставить на 10–15 мин.

3. Налить в середину стекла 1–2 мл этанола, распределить этанол чистой салфеткой по поверхности и протереть стекло вначале в одном направлении, затем перпендикулярно. Повторить обработку спиртом еще 2 раза. Оставить стекло на 5–10 мин.

4. Положить на большое стекло спэйсеры и поверх них – малое стекло обработанной стороной вниз, прижать зажимами.

5. Залить 6 % акриламидный гель между стеклами, добиваясь отсутствия пустот, после чего аккуратно вставить гребенки ровной стороной, затем добавить зажимов и выжать излишки геля. Оставить на 10–15 мин для полимеризации, затем сэндвич из двух стекол и геля между ними промыть под краном, убрать гребенки, протереть снаружи фильтровальной бумагой.

6. Закрепить сэндвич в вертикальной камере для электрофореза. Закрыть клапан между верхней и нижней частями камеры. Залить в верхнюю и нижнюю часть камеры 1х ТВЕ-буфер.

7. Закрыть камеру и подсоединить к источнику постоянного напряжения (стабилизация по мощности 75 Вт). Производить предтонку в течение 30 мин.

8. Добавить в ПЦР-продукт формамидного LD-красителя из расчета 1 : 1. Поставить пробирки с ПЦР-продуктом в амплификатор и включить программу денатурации (85 °C), дать пробиркам прогреться не менее 2 мин. Выключить напряжение, вставить гребенки зубчатой стороной в гель и вытащить, промыть образовавшиеся лунки 10х ТВЕ-буфером из шприца, залить пробы по 2,5–4 мкл в лунки из пипетки.

9. Включить напряжение и проводить электрофорез примерно 2 ч. Затем выключить напряжение, вынуть сэндвич и отделить малое стекло от большого для последующей окраски, не допуская повреждения поверхности геля.

10. В кювету с гелем залить фиксирующий раствор (10 % раствор уксусной кислоты) и инкубировать 20 мин в качающейся ванне при комнатной температуре.

11. Фиксирующий раствор слить и промыть гель три раза по 5 мин дистиллированной водой.

12. Поместить гель в окрашивающую смесь (0,1 % раствор нитрата серебра, добавить 1,5 мл формалина на 1 л раствора перед использованием) и инкубировать 30 мин в качающейся ванне при комнатной температуре.

13. Вынуть гель из окрашивающей смеси, опустить гель в дистиллированную воду (не более чем на 8 с!) и поместить в раствор для проявления (3 % раствор безводного карбоната натрия, 0,03 % NaOH; раствор охладить до 10 °С; непосредственно перед использованием добавить 1,5 мл формалина и 200 мкл тиосульфата натрия на 1 л раствора) и инкубировать, покачивая, до появления четких бурых полосок (в среднем 6–8 мин), после чего быстро добавить 10 % раствор уксусной кислоты для гашения. Продолжить покачивание 1–2 мин, затем промыть гель дистиллированной водой и оставить сушиться.

Для удаления геля стекло помещают в раствор NaOH (примерно 10 г на 1 л воды).

Лабораторная работа 19

Электрофорез в 1 % агарозном геле и ТАЕ-буфере

Материалы и оборудование: камера для горизонтального электрофореза, источник тока, амплифицированные образцы, дозаторы, наконечники, гель-документатор.

Реактивы:

1) состав 1 % агарозного геля: агароза – 1 г, 1х трис-ЭДТА-ацетатный буфер – 100 мл (п р и м е ч а н и е: для 2 % геля – 2 г агарозы на 100 мл);

2) состав 50х трис-ЭДТА-ацетатного (ТАЕ) буфера (рН 8,0): трис – 242,2 г, уксусная кислота – 89,6 мл, ЭДТА (натриевая соль) – 18,616 г. Довести дистиллированной водой до 1 л.

Ход работы:

1. Довести раствор агарозы до кипения, охладить до 60 °С, затем добавить 5 мкл этидиум бромид.
2. В заливочный столик для камеры вставить гребенки и залить гель. Дать гелю остыть (около 30 мин).
3. Вытащить гребенки, установить форму в горизонтальную камеру для электрофореза и залить в камеру 1х ТАЕ-буфер.
4. Поместить в лунки по 3–10 мкл раствора ДНК (амплифицированного). Если при ПЦР-реакции использовали смесь для ПЦР ScreenMix или окрашенный буфер, краситель добавлять не нужно.
5. Закрыть камеру, подсоединить к источнику постоянного напряжения и включить напряжение из расчета 5 В на 1 см длины геля.
6. Остановить электрофорез через 23 ч (время подбирается опытным путем).
7. Вынуть гель из формы и положить на трансиллюминатор (источник УФ-излучения) для просмотра и документации.

Лабораторная работа 20

Выделение ДНК из агарозного геля и ее очистка

Реактивы: состав NaI-буфера: $\text{NaI} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 123 г, Na_2SO_3 – 0,1 г, крезоловый красный (Na) – 0,01 г, H_2O (дистиллированная) – до 100 мл.

Цвет раствора довести уксусной кислотой (около 20 мкл) до желтого. Хранить при комнатной температуре до 2 мес.

Ход работы:

1. Вырезать нужную полоску под длинноволновым УФ (360 нм), подложив под гель фольгу, постепенно открывая нужные участки. Поместить полоску в пробирку.
2. Взвесить полоску (вес соответствует объему).
3. При концентрации агарозы в геле 1–1,5 % добавить 3 объема NaI-буфера на 1 объем геля, при концентрации 2 % – 4 объема, при повышении концентрации на 1 % прибавлять один объем.

4. Пробирку с полоской поставить в термостат и инкубировать при 50 °С 5 мин или пока вся агароза не расплавится (время от времени помешивая); убрать из термостата, дать остыть.

5. Если раствор имеет оранжевый или красный цвет, то добавить 1 мкл 10 % уксусной кислоты. Раствор должен пожелтеть.

6. Добавить 6 мкл суспензии диоксида кремния (взболтать перед добавлением).

7. Перемешать и ждать 2 мин.

8. Центрифугировать 20–30 с при 13 тыс. об/мин.

9. Жидкость слить. К осадку добавить 160 мкл NaI-буфера, тщательно перемешать, ЦФ – 20 с при 13 тыс. об/мин, убрать супернатант.

10. Добавить 0,5 мл 70 % этанола, взболтать, ЦФ – 20 с при 13 тыс. об/мин, слить жидкость.

11. Повторить пункт 10.

12. Сушить осадок 20 мин.

13. При низкой концентрации ДНК добавить 15 мкл H_2O , при высокой – 25 мкл. Взболтать.

14. Инкубировать 3 мин при 50 °С.

15. ЦФ – 30 с при 13 тыс. об/мин.

16. Перенести супернатант в новую пробирку.

17. Определить концентрацию ДНК (для секвенирования должна быть не менее 10 нг/мкл).

Приготовление суспензии диоксида кремния

1. Суспензировать с помощью магнитной мешалки 10 г SiO_2 в ~100 мл азотной кислоты в течение 2 ч. Дать отстояться, слить кислоту.

2. Шесть раз промыть в дистиллированной воде.

3. Залить дистиллированной водой в отношении примерно 1 : 1. Хранить суспензию при комнатной температуре до 1 мес.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие гели используются для электрофореза ДНК?
2. Как можно визуализировать ДНК в гелях после электрофореза?
3. Что такое интеркалирующие красители?
4. Какие меры предосторожности надо принимать при проведении электрофореза нуклеиновых кислот?
5. В чем принцип электрофореза НК?
6. Что входит в состав ТАЕ- и ТВЕ-буферов?

6. СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Еще в 50-е гг. прошлого века были разработаны методы, позволяющие определять последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Поэтому когда был расшифрован генетический код, появилась возможность восстанавливать нуклеотидную последовательность транскрибируемой ДНК по аминокислотной последовательности соответствующего белка. Однако генетический код является вырожденным. Следовательно, первичная структура ДНК, построенная на основе последовательности аминокислот, не будет однозначной. Кроме того, для эукариот таким способом можно восстановить только нуклеотидный состав экзонов, тогда как информация о последовательности интронов теряется в результате сплайсинга.

6.1. Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту: метод химической дегградации

В 1976 г. А. Максамом и У. Гилбертом был разработан метод секвенирования, основанный на специфической химической дегградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченного с одного конца. Препарат меченой ДНК разделяли на четыре аликвоты и каждую обрабатывали реагентом, модифицирующим одно или два из четырех оснований. А. Максам и У. Гилберт предложили модифицировать пуриновые основания диметилсульфатом. При этом происходит метилирование адениновых остатков по азоту в положении 3, а гуаниновых по азоту – в положении 7. Обработка образца ДНК соляной кислотой при 0 °С приводит к выщеплению метиладенина. Последующая инкубация при температуре 90 °С в щелочной среде вызывает разрыв сахарно-фосфатной цепи ДНК в местах выщепления оснований. Обработка пиперидином приводит к гидролизу образца по остаткам метилгуанина. Пиримидиновые основания

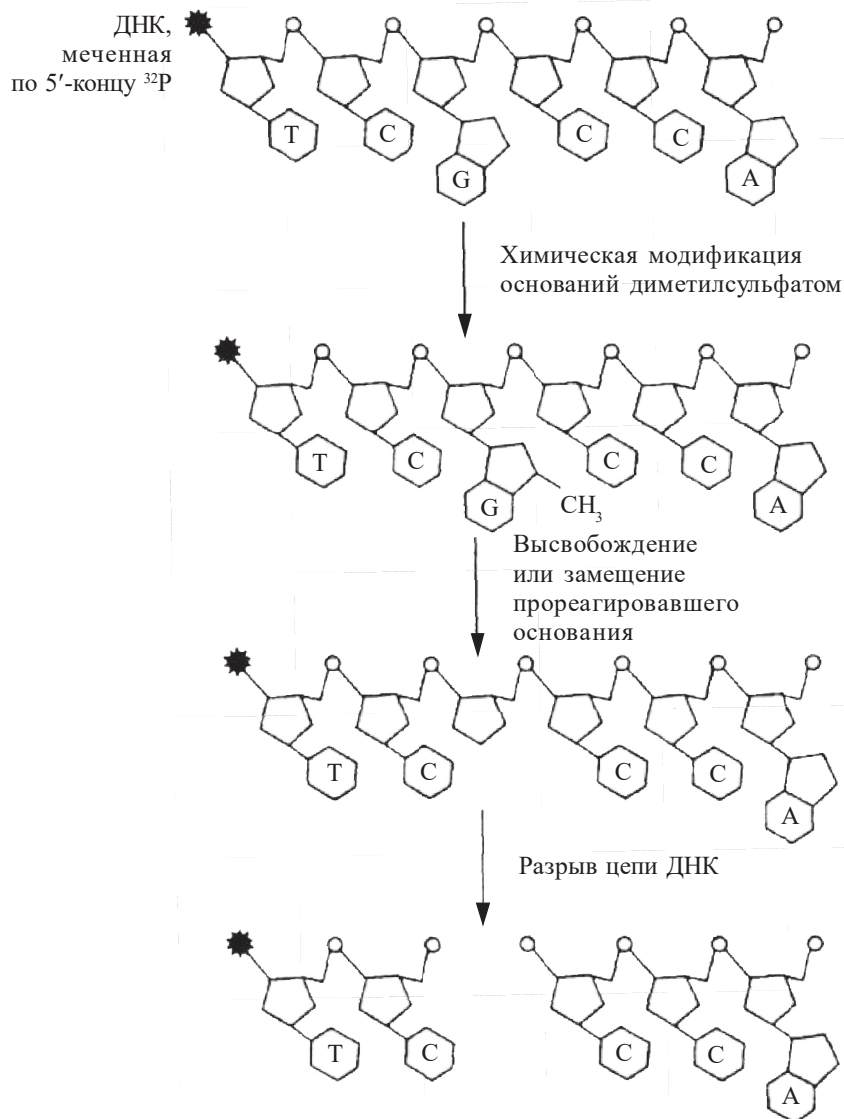


Рис. 6.1. Отщепление модифицированных звеньев цепи ДНК после обработки вторичным амином или щелочью
[Энциклопедия большой научной библиотеки]

модифицируют гидразином. Если реакцию вести в бессолевой среде, то модифицируются как цитозин, так и тимидин; если обработку вести в присутствии 2М NaCl, то модифицируется лишь цитозин. Расщепление цепи ДНК на фрагменты и в этом случае осуществляется пиперидином. Условия реакций авторы подбирали таким образом, чтобы в итоге получить полный набор субфрагментов разной длины. Последующий электрофорез в полиакриламидном геле позволяет восстановить полную структуру исследуемого фрагмента.

6.2. Секвенирование ДНК по Сэнгеру: «плюс-минус» метод

Первым методом прямого ферментативного секвенирования ДНК стал метод, предложенный Ф. Сэнгером (рис. 6.2) и Д. Коулсоном в 1975 г. [Sanger, Coulson, 1975]. В качестве матрицы в реакции полимеразного копирования использовался одноцепочечный фрагмент ДНК, в качестве праймеров – синтетические олигонуклеотиды или природные субфрагменты, получаемые при гидролизе рестрицирующими эндонуклеазами, а в качестве фермента – фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I (PolI) из *E. coli*. Метод включал два этапа. Сначала в ограниченных условиях проводили полимеразную реакцию в присутствии всех четырех типов dNTP (один из них был мечен по альфа-положению фосфата), получая на выходе набор продуктов неполного копирования матричного фрагмента. Смесь очищали от несвязавшихся дезоксинуклеозидтрифосфатов и делили на восемь частей. После чего в «плюс»-системе проводили четыре реакции в присутствии каждого из четырех типов нуклеотидов, а в «минус»-системе – в отсутствие каждого из них. В результате в «минус»-системе терминация происходила перед dNTP данного типа, а в «плюс»-системе – после него. Полученные таким образом восемь образцов разделяли с помощью электрофореза, «считывали» сигнал и определяли последовательность исходной ДНК (рис. 6.3). Этим способом была секвенирована короткая ДНК фага фХ174, состоящая из 5386 нуклеотидных пар.

Рис. 6.2. Фредерик Сэнгер –
английский биохимик,
единственный ученый в истории,
получивший две Нобелевские премии
по химии – в 1958 и 1980 гг.



6.3. Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод «терминаторов»

В основе метода секвенирования ДНК, разработанного Сэнгером и соавт. [Sanger et al., 1977], называемого также методом секвенирования путем терминации цепи, лежал принцип ферментативного построения комплементарной цепи ДНК по существующей одноцепочечной матрице при происходящем в разных местах цепи ДНК ингибировании ее дальнейшего роста.

Составляющими этого процесса являлись: одноцепочечная матрица ДНК; короткая затравочная молекула, комплементарная определенному участку матрицы; ДНК-полимераза (кленовский фрагмент ДНК-полимеразы *E. coli*); 2'-дезоксинуклеотид 5'-трифосфаты (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ или просто дНТФ); 2', 3'-дидезоксинуклеотид 5'-трифосфаты (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддЦТФ или просто ддНТФ); реакционный буфер с ионами Mg^{2+} .

Ключевым моментом этого процесса являлась терминация построения комплементарной цепи ДНК, происходящая при выборе ДНК-полимеразой модифицированных аналогов природных субстратов дидезоксинуклеозидтрифосфатов, являющихся известными

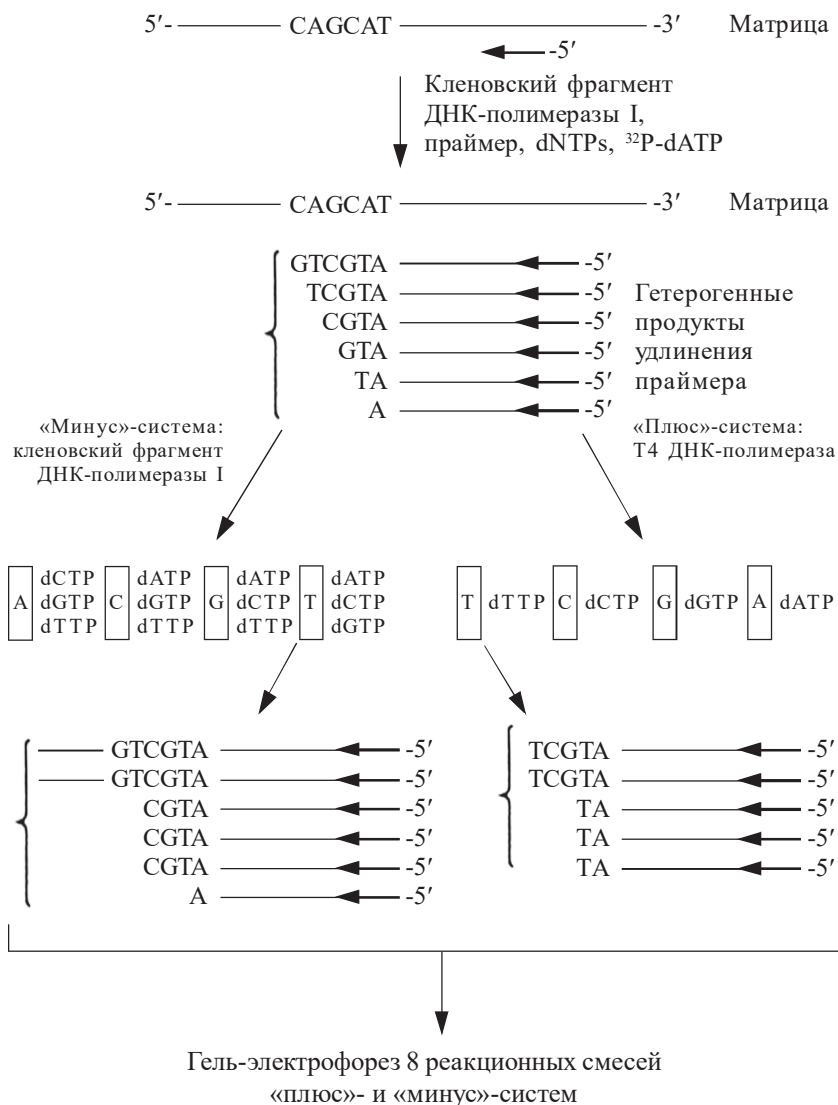


Рис. 6.3. Схема секвенирования по Сэнгеру: «плюс-минус» метод
 [Энциклопедия большой научной библиотеки]

ингибиторами ДНК-полимеразы. Отсутствие второго гидроксильного остатка в 3'-положении рибозного кольца у дидезоксипроизводных приводило к невозможности присоединения к ним следующего нуклеотида, и рост цепи таким образом прерывался. Такое терминирование происходило одновременно как бы в двух режимах: заданном и случайном. Заданность определялась тем, что в одной отдельной пробирке наряду со всеми четырьмя дНТФ (один из которых был радиоактивно меченным) присутствовал только один какой-нибудь конкретный ддНТФ, случайность же происходила от того, что включение данного ддНМФ в растущую цепь ДНК было произвольным, но, естественно, с учетом принципа комплементарности. То есть возникала некая конкуренция между дНТФ и ддНТФ при их выборе ДНК-полимеразой. Поскольку в четырех реакционных пробирках (по типу оснований – А, С, G и Т) присутствовало огромное количество молекул секвенируемой ДНК, во много раз превосходящее ту длину фрагмента, которую могла построить ДНК-полимераза, то по теории вероятности каждое положение этого типа оснований во фрагменте ДНК оказывалось представленным соответствующим ддНМФ.

Другим ключевым моментом являлся гетерогенный размер полученных фрагментов ДНК. Их гетерогенность определялась тем, что все 3'-концы фрагментов вновь синтезируемой цепи ДНК во всех четырех реакционных пробирках были терминированы соответствующими ддНМФ и, таким образом, представляли собой полный набор всех возможных длин в пределах секвенируемого участка, построенного ДНК-полимеразой. Что касается 5'-конца всех этих фрагментов ДНК, принадлежащих новой цепи, то он должен быть для всех фрагментов строго одинаковым и принадлежать 5'-концу исходной затравочной молекулы.

Продукты реакций терминирования подвергались денатурации, и уже одноцепочечные меченые фрагменты, имевшие гомогенный 5'-конец и гетерогенные 3'-концы, разделялись по длине высоковольтным электрофорезом высокого разрешения в полиакриламидном геле, позволяющим разделять фрагменты ДНК, отличающиеся всего на один нуклеотид, в четырех соседних дорож-

ках, соответствующих специфическим терминирующим реакциям, например, в последовательности Т, С, G, А. По завершении электрофореза гель экспонировался на рентгеновскую пленку и по прошествии некоторого времени (обычно от одних до двух суток) с проявленной пленки можно было «читать» последовательность нуклеотидов секвенируемого участка ДНК, начиная с нижней части геля и последовательно поднимаясь вверх по этим четырем дорожкам, соответствующим одному фрагменту ДНК (рис. 6.4).

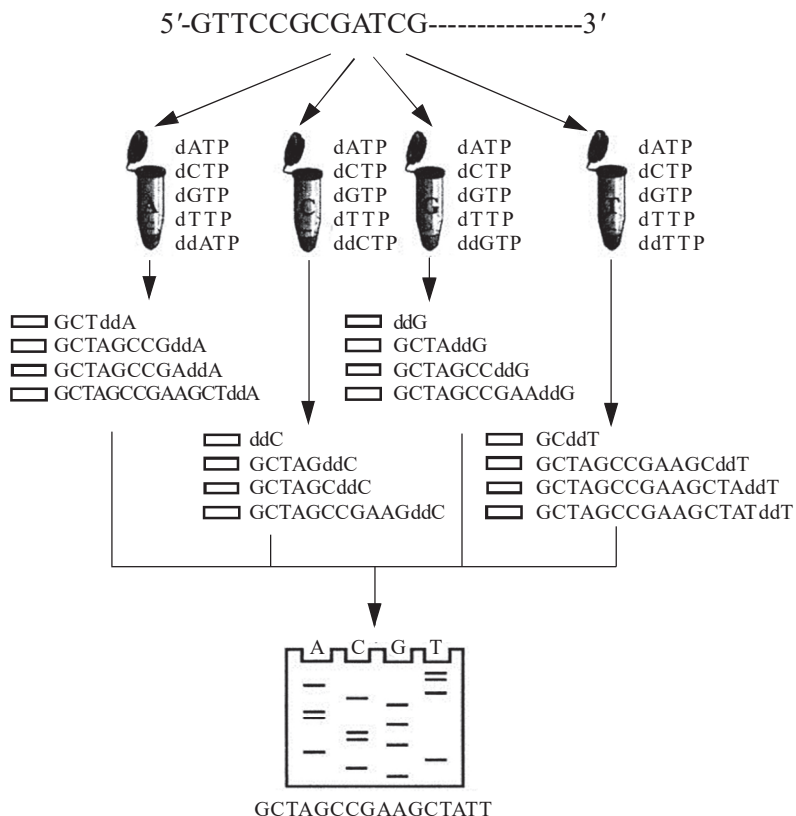


Рис. 6.4. Схема секвенирования по Сэнгеру: метод терминирования цепи
[Энциклопедия большой научной библиотеки]

6.4. Автоматическое секвенирование ДНК

В основе автоматического секвенирования лежит уже упоминавшийся выше метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих ddNTP. Как и классический вариант Сэнгера, автоматическое секвенирование включает две стадии: проведение терминирующих реакций и разделение продуктов этих реакций с помощью электрофореза. Как правило, автоматизирована лишь вторая стадия, т. е. разделение меченных фрагментов ДНК в ПААГ, получение спектра эмиссии флуорофоров и последующий обсчет собранных данных. Таким образом, автоматическое секвенирование отличается от современного ему ручного секвенирования только типом используемой метки.

Флуоресцентную метку включают либо в праймер, либо в терминатор транскрипции согласно следующим схемам: меченный праймер (четыре разных красителя) и немеченные терминаторы; меченный праймер (один краситель) и немеченные терминаторы; меченные терминаторы (каждый тип терминатора своим красителем) и немеченный праймер. Использование меченных праймеров предполагает проведение четырех независимых реакций (отдельно с каждым из терминаторов) для каждого секвенируемого образца. Использование меченных терминаторов позволяет совместить все четыре реакции в одной пробирке. Если используется единственный краситель, то разделение продуктов секвенсированной реакции в геле проводят на четырех разных дорожках. Использование четырех разных красителей позволяет разгонять продукты реакции(й) на одной дорожке.

6.5. Методы секвенирования нового поколения

Последние 20 лет доминирует автоматизированное секвенирование по методу Сэнгера. Этот метод был использован в глобальных проектах по секвенированию генома человека, различных животных, бактерий и вирусов. Однако данный метод оказался не подходящим для быстрого рутинного секвенирования человеческих геномов в клинических целях. Поэтому появилась необходимость

в изобретении новых технологий полногеномного секвенирования. Автоматизированное секвенирование по Сэнгеру считается «методом первого поколения», тогда как современные методы называются «методами нового, или второго, поколения» (Next-Generation Sequencing, NGS). В основе этих технологий находятся различные стратегии, основанные на уникальных комбинациях приготовления ДНК-матриц, секвенирования, визуализации, а также выравнивания и составления последовательностей (sequences или «сиквентов») ДНК [Metzker, 2010]. Основным преимуществом секвенирования нового поколения является рентабельность продукции огромного массива данных за короткое время.

Технология методов секвенирования нового поколения (СНП) позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. СНП осуществляется с помощью повторяющихся циклов *удлинения цепи*, индуцированного *полимеразой*, или многократного *лигирования олигонуклеотидов*. В ходе СНП могут генерироваться до сотен мегабаз и гигабаз нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл. Несмотря на разные методы получения копий (амплификация) участков генома и на техническую разницу дифференциации различных нуклеотидов в прочтенных последовательностях, общая схема работы для всех секвенаторов одна. Первый этап секвенирования – создание библиотеки случайных последовательностей ДНК, которые можно будет «сшить» с общедоступными адаптерными последовательностями. Второй этап – создание ампликонов с помощью ПЦР, которые будут использованы как образцы. Третий этап – определение первичной структуры всех фрагментов.

Основные методы секвенирования нового поколения представлены в таблице. Более подробно остановимся на трех методах: пиросеквенирование, Illumina и ионное полупроводниковое секвенирование.

Пиросеквенирование – это метод секвенирования ДНК (определение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК), основанный на принципе «секвенирование путем синтеза». При вклю-

чении нуклеотида происходит детекция высвобождающихся пирофосфатов. Технология была разработана Полом Ниреном и его студентом Мустафой Ронаги в Королевском техническом институте (Стокгольм) в 1996 г.

«Секвенирование путем синтеза» заключается в том, что для секвенирования одноцепочечной ДНК ферментативно синтезируют комплементарную цепочку. Метод пиросеквенирования основан на детекции активности фермента ДНК-полимеразы с другим хемилюминесцентным ферментом. Метод позволяет секвенировать одну цепочку нуклеотидов ДНК путем синтеза комплементарной цепочки, при этом регистрируется присоединение каждого нуклеотида. Матрица ДНК иммобилизована, растворы нуклеотидов А, С, G и Т добавляются и отмываются последовательно после реакции. Свет образуется в тот момент, когда раствор нуклеотидов соответствует первому неспаренному основанию матрицы. Последовательность растворов, которые дают хемилюминесцентный сигнал, позволяет определить последовательность матрицы.

Матрица одноцепочечной ДНК гибридизуется с праймером и инкубируется с ферментами ДНК-полимеразой, АТФ-сульфурилазой, люциферазой и апиразой, а также с субстратами аденозин-5'-фосфосульфатами (APS) и люциферинном.

1. Добавление одного из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) (в случае dATP добавляют dATP α S, который не является субстратом для люциферазы) инициирует следующий этап. ДНК-полимераза включает правильный комплементарный дезоксинуклеотид в цепочку. При этом стехиометрически высвобождается пирофосфат (PPi).

2. Фермент АТФ-сульфурилаза количественно превращает PPi в аденозинтрифосфат (АТФ) в присутствии аденозин-5'-фосфосульфата. АТФ выступает «топливом» для фермента люциферазы, которая превращает люциферин в оксилуциферин, при этом высвобождается видимый свет, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшегося АТФ. Свет образуется в реакции, катализируемой люциферазой, регистрируется камерой и далее анализируется специальной компьютерной программой.

3. Невключенные нуклеотиды и АТФ подвергаются деградации ферментом апиразой, и реакция начинается с новым нуклеотидом.

В настоящий момент существуют некоторые ограничения в применении данного способа секвенирования. Лимитирующим фактором является длина последовательности нуклеотидов, которая составляет около 300–500 нуклеотидов, тогда как длина последовательности нуклеотидов, получаемых методом обрыва цепи (например, метод Сэнгера), составляет 800–1000 нуклеотидов. Такие ограничения могут затруднять секвенирование геномов, в частности, богатых повторенными последовательностями нуклеотидов. К 2007 г. пиросеквенирование обычно использовали для повторного секвенирования или ресеквенирования геномов, для которых известна последовательность нуклеотидов родственного вида.

Метод Illumina/Solexa – метод секвенирования нового поколения, разработанный компанией Solexa. В основе метода лежит принцип секвенирования путем синтеза:

- одноцепочечные фрагменты ДНК закрепляются на твердой подложке;
- ДНК-зависимая ДНК-полимераза синтезирует комплементарную цепь;
- встраивание каждого нового нуклеотида регистрируется с помощью камеры.

В методе Solexa используются 3'-модифицированные нуклеотиды с присоединенными флюоресцентными метками разных цветов. Модификация нуклеотидов не позволяет ДНК-полимеразе присоединить больше одного нуклеотида. Флюоресценция инициируется коротким импульсом лазера, и тип присоединенного нуклеотида определяется по цвету флюоресцентной метки. Модификация нуклеотида блокируется (полимераза теперь может двигаться дальше), и цикл повторяется снова. В результате удастся определить последовательность ДНК длиной до 250 нуклеотидов. Такую последовательность ДНК называют прочтением или ридом.

Первый секвенатор Genome Analyzer 1G был представлен компанией Solexa в 2006 г. Длина прочтения составляла 30–35 нуклеотида, можно было получить около 1 Гб информации. HiSeq 2000 (2011 г.)

способен секвенировать 6 человеческих геномов за 11 дней. Длина прочтения составляет 100 нуклеотидов, можно получить 600 Гб информации.

Ионное полупроводниковое секвенирование (англ. *ion semiconductor sequencing*, синонимы: *ion torrent sequencing*, pH-опосредованное секвенирование) – метод определения последовательности ДНК, основанный на обнаружении ионов водорода, которые выделяются во время полимеризации ДНК. Это метод «секвенирования при синтезе», в ходе которого комплементарная цепь строится на основе последовательности матричной цепи.

Суть метода заключается в том, что микролунки, содержащие предназначенную для секвенирования молекулу матричной ДНК, наполняют дезоксирибонуклеотидтрифосфатом (dNTP) одного вида. Если введенный dNTP является комплементарным к матрице, он включается в растущую цепь, при этом выделяется ион водорода, который вызывает повышение электропроводности в ячейке, что является сигналом для детектора. После этого не связавшиеся нуклеотиды смываются и происходит следующий раунд синтеза, с использованием следующего нуклеотида. Если в последовательности матричной цепи присутствует повтор одного нуклеотида, несколько молекул dNTP будут присоединены в одном цикле. Это приводит к увеличению количества образовавшихся ионов водорода и пропорционально более высокому электрическому сигналу. Данная технология отличается от других технологий секвенирования тем, что не использует модифицированные нуклеотиды и оптические датчики.

Лабораторная работа 21

Подготовка образцов к сиквенсной реакции.

Метод прямого переосаждения ДНК

в мягких условиях

[http://www.genome-centre.ru/downloads/NH4Ac_EtOH.pdf]

При получении гомогенного ПЦР-продукта, представленного только одной полосой, без шлейфа, возможно использование прямого

Сравнение методов секвенирования нового поколения

Метод	Принцип	Длина одного прочтения, пар оснований	Стоимость секвени- рования 1 млн пар оснований, долл.	Стоимость секвенса- тора, тыс. долл.	Время работы за цикл	Количество прочтений за цикл	Преиму- щества	Недо- статки
454 Life Sciences	Пиросекве- нирование	400	10	500	7 ч	1 000 000	Длина прочтенных геномных участков, скорость	Стоимость, погреш- ность
Illumina- SOLEXA	SBS (sequencing- by-synthesis)	300	0,05–0,15	600	9 дней	До 3 000 000 000	Эффек- тивность, стоимость	Скорость
IonTorrent	Ионный полу- проводник	200	1	50	1,5 ч	До 5 000 000	Стоимость, скорость	Погреш- ность
				595	9 дней	1 300 000 000	Стоимость	Скорость
SOLID	Секвенирова- ние на основе лигирования	35–50	0,13					
Helicos	HeliScope	2900	2		1 ч	35 000–75 000	Длина прочтенных геномных участков, скорость	Низкая производи- тельность при желе- зной малой погрешности, стоимость

осаждения в мягких условиях для очистки от праймеров и других компонентов ПЦР-реакции, без использования коммерческих наборов.

Материалы и оборудование: ПЦР-продукт, центрифуга, дозаторы, наконечники.

Реактивы: смесь NH_4Ac + EtOH (конечная концентрация ацетата аммония – 0,125 М, этанола – 70 %): деионизированная H_2O – 4,7 мкл, NH_4A 5М – 1,5 мкл, Et OH 96 % – 43,8 мкл.

Примечание. Смесь следует заранее достать из холодильника, чтобы она нагрелась до комнатной температуры!

Ход работы:

1. Добавить по 50 мкл смеси ацетата аммония с этанолом на 10 мкл ПЦР-смеси, перемешать на вортексе или переворачиванием.

2. Высаживание проводить при комнатной температуре в течение 20 мин, затем центрифугировать при 14 тыс. об/мин в течение 20 мин.

3. Удалить супернатант, осадок промыть в 250–500 мкл 70 % этанола комнатной температуры и высушить в термостате или вакуумной центрифуге.

Примечание. При высаживании из большего объема количество этанола для промывки следует увеличить.

4. Растворить в деионизованной воде, определить концентрацию на агарозном геле и использовать аликвоту для постановки сиквенсной реакции.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое секвенирование биополимеров?
2. Какие методы секвенирования НК вам известны?
3. В чем смысл метода секвенирования по Сэнгеру?
4. Какое практическое значение имеет секвенирование ДНК?
5. Почему перед секвенированием образец ДНК необходимо амплифицировать, а после этого – дополнительно очистить?
6. Что позволило автоматизировать процесс секвенирования ДНК по Сэнгеру?

7. МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДНК. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ

В последние десятилетия с введением в генетику растений молекулярных методов исследования появилось представление о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе наследования и формирования полезных признаков у растений, были составлены хромосомные карты наиболее важных сельскохозяйственных культур с нанесенными на них молекулярными маркерами и генами, произошло внедрение молекулярных методов в селекционно-генетические исследования, возникло понятие молекулярной паспортизации сортов. Помимо очевидного практического значения применение молекулярных методов позволило существенно расширить фундаментальные исследования в области генетики и эволюции растений [Хлесткина, 2011, с. 757].

7.1. Особенности растительного генома

Изучение геномов растений – задача значительно более сложная, чем исследование генома человека и других животных. Это связано со следующими обстоятельствами:

1) огромные размеры геномов растений: так, у некоторых видов растений они достигают десятков и даже сотен миллиардов пар нуклеотидов; геномы основных хозяйственно важных растений (кроме риса, льна и хлопка) по размерам либо близки к геному человека, либо превышают его во много раз;

2) изменение числа хромосом в широких пределах – от двух у некоторых видов до нескольких сотен у других, причем не удается выявить строгой корреляции между размером генома и числом хромосом;

3) огромное количество полиплоидных форм с близкими, но не идентичными геномами;

4) чрезвычайная обогащенность геномов растений (до 99 %) «незначашей» ДНК, что резко затрудняет стыковку отсековированных фрагментов в общий крупноразмерный участок ДНК;

5) неполное (по сравнению с геномами дрозофилы, человека и мыши) морфологическое, генетическое и физическое картирование хромосом;

6) невозможность выделения в чистом виде индивидуальных хромосом с помощью методов, обычно применяемых с этой целью для хромосом человека и животных;

7) затрудненное хромосомное картирование отдельных генов с помощью гибридизации *in situ*, обусловленной как высоким содержанием в геномах растений «незначашей» ДНК, так и особенностями структурной организации хромосом растений;

8) эволюционная отдаленность растений от животных, что серьезно осложняет использование для изучения геномов растений сведений, полученных при секвенировании генома человека и других животных;

9) длительный процесс размножения большинства растений, что существенно замедляет их генетический анализ.

7.2. Молекулярные маркеры

Молекулярные маркеры (синоним – **ДНК-маркеры**) – это генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. ДНК-маркеры являются третьим поколением генетических маркеров. Им предшествовали **белковые маркеры**, а еще ранее – **классические генетические маркеры**.

В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. Их разделяют на три группы, согласно основному методу анализа: 1-я – маркеры, исследуемые с помощью блот-гибридизации; 2-я – с помощью ПЦР и 3-я – с помощью ДНК-чипов.

Данная классификация отражает процесс «эволюции» ДНК-маркеров. Первая из трех перечисленных выше групп представляет собой первое поколение ДНК-маркеров, получивших широкое

распространение в 1980-е гг. В 1990-е гг. ключевые позиции заняли ПЦР-маркеры, в 2000-е гг. их существенно потеснили молекулярные маркеры, основанные на использовании ДНК-чипов (рис. 7.1). В последние 2–3 года для анализа полиморфизма ДНК все чаще используют метод прямого секвенирования генома или его отдельных участков.

	Моно- локусные	Мульти- локусные
Блот- гибридизация	RFLP ₁₉₈₀	Микро- сателлиты ₁₉₈₅
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	SSR ₁₉₈₉	RAPD ₁₉₉₀
	STS ₁₉₈₉	ISSR ₁₉₉₄
	SSCP ₁₉₈₉	AFLP ₁₉₉₅
	CAPS ₁₉₉₃	SSAR ₁₉₉₇
	SCAR ₁₉₉₃	IRAP ₂₀₀₆
ДНК-чипы	SNP ₁₉₉₈	DArT ₂₀₀₁

Рис. 7.1. Схематическая классификация молекулярных маркеров и год их первого упоминания в публикациях: слева указан основной метод, используемый для анализа данного класса маркеров [Хлесткина, 2013, с. 1045]

К молекулярным маркерам наравне с классическими генетическими применяют термины *локус*, *аллель*, *доминантный*, *кодоминантный* (рис. 7.2). Молекулярные маркеры подразделяют на моно-

локусные и мультилокусные. Монолокусные маркеры наследуются чаще всего по кодоминантному типу, мультилокусные – по доминантному. Если метод анализа маркера позволяет выявлять оба аллеля, говорят о кодоминантном типе наследования данного маркера (слева), если выявляется только один аллель – о доминантном наследовании (справа) (рис. 7.3).

Основные классы молекулярных маркеров

AFLP (amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов.

CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности.

DArT (diversity array technology) – ДНК-чип технология для изучения разнообразия.

IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретро-транспозонами.

ISSR (inter simple sequence repeats) – межмикросателлитные последовательности.

RAPD (random amplified polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК.

RFLP (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов.

SCAR (sequence characterized amplified region) – амплифицированная область, охарактеризованная нуклеотидной последовательностью.

SNP (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм.

SSAP (sequence-specific amplification polymorphism) – полиморфизм сиквенс-специфичной амплификации.

SSCP (single strand conformation polymorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК.

SSR (simple sequence repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты).

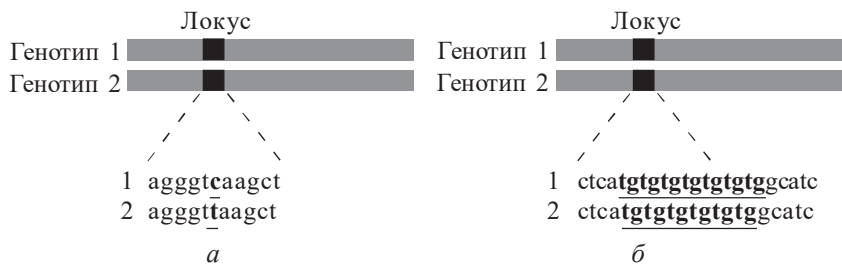


Рис. 7.2. Причины вариабельности локуса:
a – замена нуклеотида; *б* – делеция [Хлесткина, 2013, с. 1046]

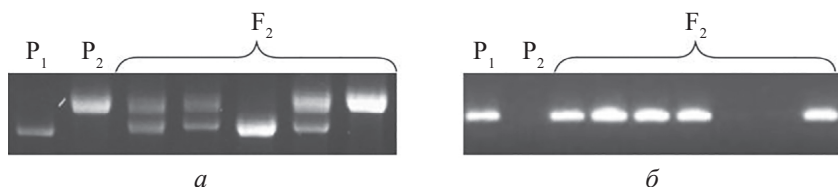


Рис. 7.3. Кодоминантный (*a*) и доминантный (*б*) тип наследования
 [Хлесткина, 2013, с. 1046]

При выборе оптимального маркера принято прибегать к следующим критериям оценки:

1) универсальность: какие из последовательностей могут быть амплифицированы и отсеквенированы в максимальном количестве растительных таксонов. В первую очередь этот показатель зависит от возможности подобрать универсальные для широкого круга организмов праймеры для амплификации фрагмента, который впоследствии подлежит секвенированию;

2) качество сиквенса и степень перекрытия: какие из локусов наиболее пригодны для получения перекрывающихся сиквенсов с прямого и обратного праймеров с минимумом неоднозначностей прочтения нуклеотидов или их отсутствием;

3) способность различать виды: какие из локусов дают возможность различить как можно большее количество видов. Оптимальной является ситуация, при которой внутривидовой полиморфизм ниже межвидового, а формы, относящиеся к одному виду,

кластеризуются отдельно от форм других видов. Исходя из предложенных критериев, рассмотрим различные молекулярные маркеры подробнее [Хлесткина, 2013].

7.3. RAPD-анализ

Случайно амплифицированная полиморфная ДНК (**RAPD – random amplified polymorphic DNA**) – метод амплификации ДНК-сегментов с использованием случайных праймеров (примерно 10 нуклеотидов), не требует предварительного знания последовательности ДНК, однако вследствие стохастической природы ДНК для амплификации важна оптимизация и поддержание соответствующих условий для получения воспроизводимых результатов.

Свойства RAPD-маркеров:

- высокая чувствительность к изменениям условий реакций;
- достаточно низкая температура отжига – 37 °С (увеличена вероятность образования продуктов амплификации с большим количеством неспаренных оснований);
- RAPD-маркеры ведут себя как доминантные и их гетерозиготное состояние на отличается от гомозиготного, поэтому снижается точность оценки при популяционном анализе и при идентификации генетических ресурсов в сравнении с кодоминантными маркерами;
- присутствие высокоочищенной неконтаминированной ДНК;
- низкая воспроизводимость результатов ПЦР;
- необходимость большой выборки (для повышения достоверности).

Но все же RAPD-анализ может служить своеобразным экспресс-методом выявления генетического полиморфизма, что особенно актуально для малоизученных таксономических групп, а также как источник уникальных локус-специфичных маркеров. Еще этот метод может применяться в селекции для идентификации сортов и пород [Чесноков, с. 29].

Диагностические возможности RAPD-технологии успешно проиллюстрированы на многочисленных примерах описания

генетического разнообразия микроорганизмов, высших растений, беспозвоночных и позвоночных животных.

Например, в 2010 г. RAPD-маркеры были использованы для выявления внутривидового полиморфизма *Lathyrus sativus* L. по генотипу. Использование RAPD-анализа позволило классифицировать изученные образцы на внутривидовые группы *L. sativus*, соответствующие эколого-географической дифференциации вида и его эволюции как культуры [Бурляева, Вишнякова, с. 754].

7.4. ISSR-маркирование

Межмикросателлитные последовательности (**ISSR – Inter-Simple Sequence Repeat**) – маркеры, которые были разработаны как альтернатива RAPD-анализу. Мы дадим более полную характеристику этим маркерам по сравнению с предыдущими типами молекулярных маркеров.

Для создания ISSR-маркеров используют праймеры, комплементарные микросателлитным повторам (4–12 единиц повтора) и несущие на одном из концов последовательность из двух-четырех произвольных нуклеотидов (так называемый «якорь») [Календарь, Глазко] (рис. 7.4).

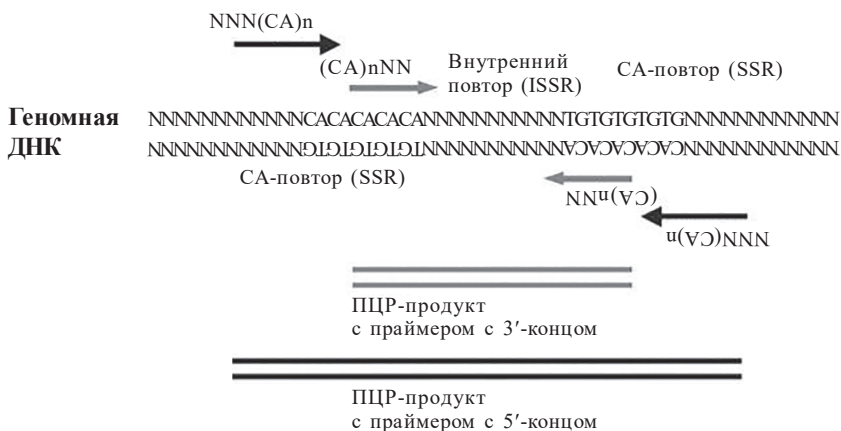


Рис. 7.4. Амплификация внутреннего простого повтора (ISSR) с использованием праймеров с 3'- и 5'-концом [SilkSatdb]

Такие праймеры позволяют амплифицировать фрагменты уникальной ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями. В результате амплифицируется большое число фрагментов, представленных на электрофореграмме дискретными полосами (рис. 7.5).

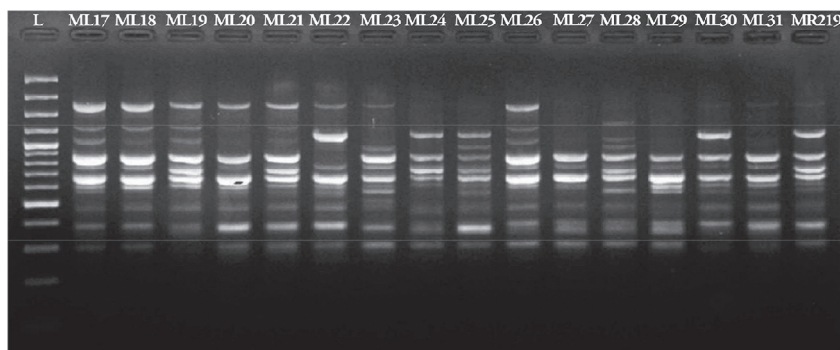


Рис. 7.5. ISSR-профиль мутантных линий риса (ML17–ML31) с праймером ISSR4:

L – Ladder, маркер молекулярного веса; MR219 – контроль
[Oladosu et al., p. 260]

Полученные ПЦР-продукты относятся к маркерам доминантного типа наследования, полиморфизм которых тестируется по наличию/отсутствию полосы. Для создания ISSR-маркеров не требуется предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК [Новиков].

ISSR-маркеры позволяют одновременно определить изменчивость по группе не связанных между собой локусов, что особенно ценно для сохранения и использования генетических ресурсов. Такая информация дает возможность оценить генетический дрейф, происходящий в экосистемах, а также эффективно проводить мониторинг популяций редких и исчезающих видов растений, находящихся на охраняемых территориях.

Основные преимущества ISSR-метода:

– данный метод обладает хорошей воспроизводимостью и может быть с успехом использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации групп растений различного таксономического ранга, а в ряде случаев и для индивидуального генотипирования;

– ISSR-маркеры довольно дешевы в использовании, не требуют предварительных знаний о последовательности ДНК и вместе с тем дают более воспроизводимые результаты, чем RAPD-маркеры [Календарь, Глазко].

Следует отметить, что в геномах растений и животных количество микросателлитных повторов очень велико, что делает этот метод удобным для генетического анализа. Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут использоваться как якорные последовательности к этим генам.

Но для ISSR-маркеров локализация в геноме продуктов амплификации, так же, как и функция, остаются неизвестными, что является существенным недостатком этого метода.

ISSR-метод используется для выявления генетического полиморфизма растительного материала, для идентификации генетического полиморфизма видов растений с различными целями (классификация, идентификация, паспортизация и т. д.) как в природных популяциях, так и у культурных растений. Помимо оценки биоразнообразия, молекулярные маркеры применяются для исследования происхождения, доместикации видов и их последующей миграции, для географической локализации популяций, имеющих разное генетическое происхождение, получения информации по филогенетическим взаимоотношениям между видами. ISSR-метод в филогенетике подходит главным образом для близкородственных видов.

7.5. SSR-маркеры

Простые повторяющиеся последовательности или микросателлиты (**SSR – simple sequence repeat**) – участки ДНК, состоящие из тандемов повторяющихся единиц: *моно-, ди-, три-, тетра-* или *пента-*нуклеотидов [Календарь, Глазко].

Этот тип генетических маркеров приобрел в последнее десятилетие большую значимость благодаря таким свойствам, как:

- Алели** **Повторы**
- 1** ⇒ SACACACACACACACACACACA ⇐
- 2** ⇒ SACACACACACACACACACACACACACA ⇐
- 3** ⇒ SACACACACACACACACACACACACACACACA ⇐
- ⇒ Прямой праймер
⇐ Обратный праймер
- Генотипы**
- | 1/1 | 2/2 | 3/3 | 1/2 | 1/3 | 2/3 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | | |

Недостатком является сложность и высокая стоимость разработки праймеров, поскольку для создания праймеров необходимо клонирование и секвенирование произвольных участков ДНК, выявление микросателлитных повторов и определение фланкирующих областей таких участков генома для определения специфического локуса.

Микросателлиты активно используются при изучении филогеографии, структуры популяций, сортовой идентификации, выявления источника происхождения [Омашева и др., с. 21].

7.6. AFLP-метод

Полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (**AFLP – amplified fragment length polymorphism**) является сложным методом анализа, состоящим из нескольких этапов. В анализе используется праймер с искусственно добавленной последовательностью [Календарь, Глазко].

Суть данного метода можно описать следующей схемой (рис. 7.7):

- Геномная ДНК рестрицируется двумя рестриктазами (EcoRI и MseI) с образованием фрагментов с выступающими 3'-концами.
- Рестрицированная геномная ДНК легируется с адаптером, содержащим «липкие» концы для данных рестрикционных сайтов. Таким образом, праймеры состоят из адаптера и последовательности нескольких нуклеотидов (1–5), специфичных для узнавания ферментом рестрикции.
- Далее проводятся две последовательные ПЦР: в первой ПЦР используются праймеры, полностью комплементарные адаптерам EcoRI и MseI, в результате чего образуется большое количество продуктов амплификации между адаптерами EcoRI и MseI, которые невозможно дифференцировать с помощью электрофореза. Поэтому во второй ПЦР праймеры с адаптерами EcoRI и MseI содержат на 3'-конце дополнительные и некомплементарные адаптерам основания (от 1 до 4) для селективной амплификации.
- Разделение фрагментов ДНК проводят в полиакриламидном геле с радиоактивной или с флуоресцентной меткой.

Получаемый фингерпринт ДНК обычно высокополиморфен и, как правило, хорошо воспроизводим.

Можно перечислить следующие свойства AFLP-анализа:

- 1) полиморфизм AFLP выше, чем RAPD и ISSR;
- 2) высокая воспроизводимость результатов;
- 3) этот метод позволяет определять генетические изменения, вызванные точечными мутациями в сайтах рестрикции или в участ-

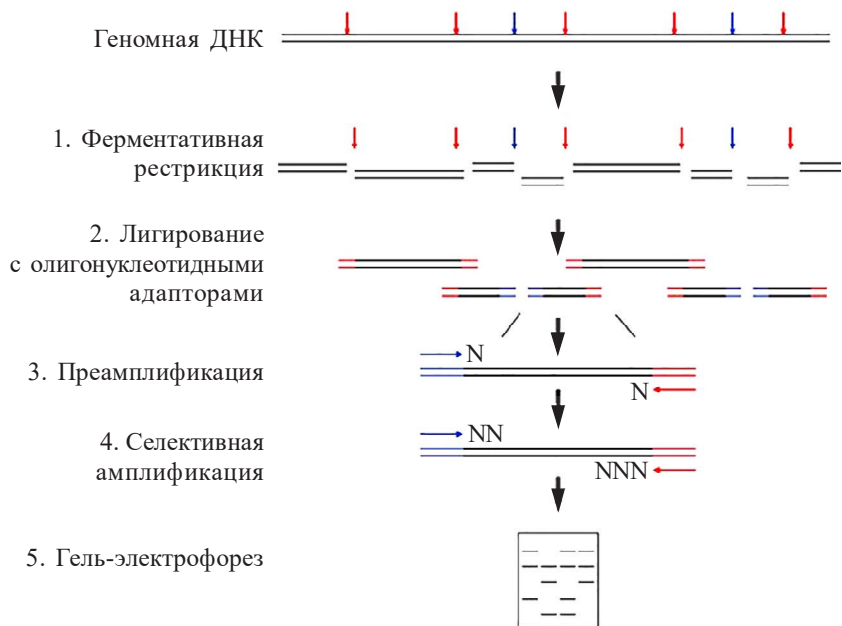


Рис. 7.7. Основной принцип AFLP-анализа
[Scitable by nature education]

ках отжига праймеров (присутствие или отсутствие продукта амплификации в спектре) и небольшими вставками и (или) делециями внутри рестриционного фрагмента (изменение размера полосы в спектре);

4) молекулярно-генетические маркеры легко картируются на хромосомах.

Воспроизводимость и высокое количество информативных фрагментов в реакции позволяет использовать метод в различных аспектах: изучение генетической идентичности, идентификация сортов и клонов, филогенетические связи, картирование [Чесноков].

7.7. SNP

Типирование аллелей с помощью секвенирования, или установления нуклеотидной последовательности ДНК-локусов, является наиболее точным из всех перечисленных методов. На первом этапе анализа полученные данные спектрограммы продуктов секвенирующей реакции с помощью программного обеспечения преобразуются в последовательность буквенных символов, обозначающих нуклеотиды в молекуле ДНК. Окончательный результат секвенирования может быть представлен в виде отчета, содержащего информацию о нуклеотидной последовательности образца, точности определения каждого из нуклеотидов, параметров электрофоретического разделения и др.

На следующем этапе составляется база данных (см. таблицу) нуклеотидных структур аллелей с указанием их наименования. Затем при проведении анализа каждого нового образца его нуклеотидная последовательность сравнивается с уже имеющимися в базе данных вариантами. В случае полного совпадения генотип исследуемого образца описывается с помощью символов, предложенных для данных аллелей. При появлении нового аллеля ему присваи-

**Нуклеотидная последовательность
и обозначение аллельных вариантов с указанием типа перестроек**

Название аллеля	Нуклеотидная последовательность вариабельного фрагмента
W (аллель дикого типа)	AGGTGACAGTACCGTAAGTCAGTTGCGATTGAACGTGCATG
C12A (замена нуклеотида)	AGGTGACAGTA <u>A</u> CGTAAGTCAGTTGCGATTGAACGTGCATG
del18AA (делеция)	AGGTGACAGTACCGT <u>IG</u> TCAGTTGCGATTGAACGTGCATG
Ins12A (вставка)	AGGTGACAGTAC <u>A</u> CGTAAGTCAGTTGCGATTGAACGTGCATG

Примечание. В скобках указан тип перестроек.

вается новая буквенная или цифровая символика, которая заносится в базу данных аллельных вариантов. Изучение нуклеотидных последовательностей позволяет установить степень генетического сходства/различия аллелей, их филогенетическую взаимосвязь и т. д.

В настоящее время существует большое количество баз данных нуклеотидных последовательностей различных организмов. Наиболее известной является «Генный банк» (Gene Bank), представленный на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Анализ полученных данных секвенирования производится с помощью поисковой системы BLAST, которая позволяет выявлять как идентичные, так и наиболее сходные гомологичные последовательности [Падутов и др.].

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое генетические маркеры?
2. Какую информацию об организме может дать генетическое маркирование?
3. Что такое RAPD-анализ? Каковы его достоинства и недостатки?
4. Что такое ISSR-анализ? В чем его отличия от RAPD?
5. Назовите методы генетического анализа, основанные на амплификации со специфическими праймерами.
6. В чем суть метода RFLP?
7. В чем суть метода AFLP?
8. Как выявить полиморфизм на уровне отдельных нуклеотидов?
9. У вас есть организм с неизвестным геномом. Необходимо оценить степень полиморфизма в его популяции. Какой метод анализа вы будете использовать?
10. Сравните различные методы генетического маркирования. Назовите их достоинства и недостатки. Каковы области применения данных методов?

СПИСОК БИБЛИОГРАФИЧЕСКИХ ССЫЛОК

Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М. : Академкнига, 2003. 432 с.

Бикбулатова С. М., Чемерис Д. А., Никонов Ю. М. и др. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Вестн. Башк. ун-та. 2012. Т. 17, № 1. С. 50–67.

Большой лабораторный практикум по биохимии. Ч. 2 : Биохимия белков и пептидов : учеб-метод. пособие для вузов / И. А. Сорокина, Е. М. Вечканов. Ростов н/Д : КОПИ-ЦЕНТР, 2010. 96 с.

Бурляева М. О., Вишнякова М. А. Фенотипическое и генотипическое разнообразие *Lathyrus sativus* L. из коллекции ВИР // Вестн. ВОГиС. 2010. Т. 14, № 4. С. 247–259.

Великов В. А. Молекулярная биология : практ. руководство. Саратов : Сарат. источник, 2013. 84 с.

Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М. : Мир, 2002. 589 с.

Гончаренко Г. Г., Падутов В. Е., Потенко В. В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гомель : Белорус. НИИ лес. хоз-ва, 1989. 164 с.

Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений. Л. : Агропромиздат, 1987. 430 с.

Журавлев Ю. Н. Молекулярные маркеры для сохранения редких видов растений Дальнего Востока // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 6. С. 953–964.

Календарь Р. Н., Глазко В. И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2002. Т. 34. С. 141–156.

Ковальчук Л. В., Игнатьева Г. А., Ганковской Л. В. Иммунология: практикум : учеб. пособие. М. : ГЭОТАР – Медиа, 2010. Ч. 2. 194 с.

Левитес Е. В. Генетика изоферментов растений. Новосибирск : Наука, Сиб. отд-ние, 1986. 143 с.

Лекции по биологии : в 2 кн. Ч. 1 : Цитология и генетика / под ред. проф. Т. В. Викторовой. Уфа : Изд-во БГМУ, 2012. 192 с.

Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / под ред. Вл. В. Кузнецова. М. : Бином, 2012.

Научно-производственная фирма Литех : [сайт]. URL: http://www.lytech.ru/articles_129.htm (дата обращения: 16.11.2012).

Новиков П. С. Подбор ISSR-праймеров для фрагментного анализа ДНК сосны обыкновенной // Научному прогрессу – творчество молодых : сб. материалов междунар. молодеж. научн. конф. по естеств.-науч. и техн. дисциплинам, 15–16 апр. 2011 г. : в 3 ч. Йошкар-Ола : Марийский гос. техн. ун-т, 2011. Ч. 3. С. 35–36.

Омашева М. Е., Аубакирова К. П., Рябушкина Н. А. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования // Биотехнология: теория и практика. 2013. № 4. С. 20–28.

Основы полимеразной цепной реакции : метод. пособие / сост. В. В. Зорина. М. : ДНК-технологии, 2012. 80 с.

Падутов В. Е., Баранов О. В., Воронаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск : Юнипол, 2007. 176 с.

Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Ч. 2 : Методы молекулярной диагностики : учеб.-метод. пособие / авт. : А. Д. Перенков, Д. В. Новиков, С. Г. Фомина и др. Н. Новгород : Нижегород. гос. ун-т им. И. Н. Лобачевского, 2015. 44 с.

ПЦР в реальном времени / под. ред. Д. В. Ребрикова. М. : Бином, 2009.

Рябушкина Н. А., Омашева М. Е., Галиакбаров Н. Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов // Биотехнология. Теория и практика. 2012. № 2. С. 9–26.

Стручкова И. В., Кальясова Е. А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле : [электрон. учеб.-метод. пособие]. Н. Новгород : Нижегород. гос. ун-т, 2012. 60 с.

Учебно-методическое пособие к проведению лабораторных работ и контроля самостоятельной работы студентов по молекулярной биологии Академии биологии и биотехнологии ЮФУ / О. Ш. Карапетян, Е. М. Вечканов, И. А. Сорокина. Ростов н/Д : Изд-во ЮФУ, 2015. 116 с.

Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17, № 4. С. 1044–1054.

Хлесткина Е. К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15, № 4. С. 757–768.

Чесноков Ю. В. RAPD-анализ коллекционных образцов дикой и культурной свеклы (*Beta L.*) // Сельскохозяйственная биология. 2013. № 3. С. 28–35.

Энциклопедия большой научной библиотеки : [сайт]. URL: <http://enc.sci-lib.com/article0001460.html> (дата обращения: 03.10.2016).

Beauchamp C. O., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. Vol. 44. P. 276–287.

Bioinformatics center. Primer Machin // Birla Institute of Scientific Research : [сайт]. URL: <http://bioinfo.bisr.res.in/cgi-bin/project/primer/index.cgi> (дата обращения: 03.10.2016).

Devey M. E., Bell J. S., Smith D. N. et al. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 1996. Vol. 92. P. 673–679.

FindPatent.ru – патентный поиск, 2012–2017 : [сайт]. URL: <http://www.findpatent.ru/patent/240/2405837.html> (дата обращения: 06.11.2016).

Hunter R. L., Markert C. L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoreses in starch gels // *Science.* 1957. Vol. 225. P. 1294–1295.

Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 227. P. 680–685.

Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor : Laboratory Press, 1989. 321 p.

Maxam A. M., Gilbert W. A new method of sequencing DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. Vol. 74. P. 560–564.

Metzker M. L. Sequencing technologies – the next generation // *Nat Rev Genet.* 2010. Vol. 11. P. 31–46.

Molnár I., Kubaláková M., Šimková H. et al. Chromosome isolation by flow sorting in *Aegilops umbellulata* and *Ae. comosa* and their allotetraploid hybrids *Ae. biuncialis* and *Ae. geniculata* // *PLoS ONE.* 2011.

Oladosu Y., Rafii M. Y., Abdullah N. et al. Genetic variability and diversity of mutant rice revealed by quantitative traits and molecular markers // *Agrociencia.* 2015. Vol. 49, № 3. P. 249–266.

Pauling L., Itano H. A., Singer S. J., Wells I. C. Sickle cell anemia: a molecular disease // *Science.* 1949. Vol. 110. P. 543–548.

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science.* 1988. Vol. 239. P. 487–491.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. Vol. 74, № 12. P. 5463–5467.

Sanger F., Coulson A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // J. Mol. Biol. 1975. Vol. 94. P. 444–448.

Semerikov V. L., Lascoux M. Nuclear and cytoplasmic variation within and between Eurasian *Larix* species // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 1113–1123.

Scitable by nature education. A collaborative learning space for science : [сайт]. URL: http://www.cdfd.org.in/SILKSAT/index.php?f=protocol_ssr (дата обращения: 03.10.2016).

SilkSatdb. A silkworm microsatellite database : [сайт]. URL: <http://www.cdfd.org.in/SILKSAT/index.php?f=silkbio> (дата обращения: 03.10.2016).

Vos P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucleic Acids Research. 1995. Vol. 23. P. 4407–4414.

ГЛОССАРИЙ

Аденин – азотистое основание, аминопроизводное пурина (6-амино-пурин). Образует две водородные связи с урацилом и тиминем (комплементарность).

Аллели (от греч. *ἄλληλων* – друг друга, взаимно) – различные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом и определяющие альтернативные варианты развития одного и того же признака.

Ампликон (амплификат) – ПЦР-продукт, образующийся в процессе реакции.

Амплификатор ДНК (термоциклер) – прибор, необходимый для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР); позволяет задавать нужное количество циклов и выбирать оптимальные временные и температурные параметры для каждой процедуры цикла.

Амплификация – увеличение числа копий генов (количества ДНК).

Антикодон – последовательность из трех нуклеотидов в молекуле транспортной РНК, комплементарная кодирующему триплету в молекуле мРНК.

Банк (библиотека) генов – полный набор генов данного организма, полученный в составе рекомбинантных ДНК.

Биополимеры – класс полимеров, встречающихся в природе в естественном виде. Входящие в состав живых организмов белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, лигнин. Биополимеры состоят из одинаковых (или схожих) звеньев-мономеров. Мономеры белков – аминокислоты, нуклеиновых кислот – нуклеотиды, полисахаридов – моносахариды.

Блот-гибридизация по Саузерну (саузерн-блоттинг) – метод идентификации участков ДНК, содержащих комплементарные ДНК-зонду последовательности, среди электрофоретически разделенных фрагментов ДНК, фиксированных на твердом матриксе (нитроцеллюлозных или нейлоновых фильтрах).

Блоттинг – перенос молекул ДНК, РНК или белка из геля, в котором шел электрофорез, на фильтр (мембрану).

Буферный раствор – раствор, к которому можно добавить умеренное количество сильной кислоты или сильного основания без существенных изменений его pH (кислотности или щелочности). Обычно буферные растворы состоят из смеси либо слабой кислоты с одной из ее солей, кислотой и нормальной соли, либо двух солей кислот.

Вектор – самостоятельно реплицирующаяся молекула ДНК, способная включать чужеродную ДНК (гены) и переносить ее в клетки, наследственные свойства которых нужно изменить.

Вектор для клонирования – любая небольшая плаزمиды, фаг или ДНК-содержащий вирус животных, в которые может быть встроена чужеродная ДНК.

Водородная связь – химическая связь, образующаяся между некоторыми молекулами, содержащими водород. Атом водорода должен быть связан с электроотрицательным (отталкивающим электроны) атомом; связь возникает между положительным зарядом атома водорода и отрицательным зарядом атома в прилегающей молекуле. Водородная связь имеется в воде, а также во многих биологических системах.

Гель – твердая, часто студнеобразная коллоидная система, состоящая из жидкой дисперсионной среды, заключенной в пространственную сетку, образованную соединившимися частицами дисперсной фазы; все плотные ткани организма по структуре представляют собой гели.

Ген – последовательность нуклеотидов в ДНК, которая кодирует определенную РНК.

Генетический код – соответствие между триплетами в ДНК (или РНК) и аминокислотами белков.

Генная инженерия – совокупность приемов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы.

Геном – общая генетическая информация, содержащаяся в генах организма, или генетический состав клетки.

Генотип – 1) вся генетическая информация организма; 2) генетическая характеристика организма по одному или нескольким изучаемым локусам.

Ген-регулятор – ген, кодирующий регуляторный белок, активирующий или подавляющий транскрипцию других генов.

Ген-репортер – ген, чей продукт определяется с помощью простых и чувствительных методов и чья активность в тестируемых клетках в норме отсутствует. Используется в генно-инженерных конструкциях для подтверждения наличия вектора.

Ген-усилитель (энхансер) – короткий сегмент ДНК, который влияет на уровень проявления (экспрессии) определенных генов, увеличивая частоту инициации и транскрипции.

Гибридизация ДНК, гибридизация нуклеиновых кислот – соединение *in vitro* комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну молекулу. При полной комплементарности объединение происходит легко и быстро, а в случае частичной некомплементарности слияние цепочек замедляется, что позволяет оценить степень комплементарности. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК.

Гуанин – азотистое основание, аминопроизводное пурина (2-амино-6-оксопурин), является составной частью нуклеиновых кислот. В ДНК при репликации и транскрипции образует три водородные связи с цитозином (комплементарность). Впервые выделен из гуано.

ДНК-дактилоскопия или геномная дактилоскопия – система научных методов биологической идентификации индивидуумов (организмов) на основе уникальности последовательности чередования нуклеотидов в цепочке ДНК каждого живого существа (за исключением одной-двух близнецов), своеобразного «генетического отпечатка», остающегося индивидуальным и неизменным на протяжении всей жизни индивидуума (организма)

Делеции (от лат. *deletio* – уничтожение) – хромосомные перестройки, при которых происходит потеря участка хромосомы. Делеция может быть следствием разрыва хромосомы или результатом неравного кроссинговера. По положению утерянного участка хромосомы делеции классифицируют на внутренние (интерстициальные) и концевые (терминальные).

Денатурация (лат. *denaturatus*: *de-* – приставка, означающая отделение, удаление и *nature* – природа, естество) – лишение естественных свойств. Денатурация биополимеров – изменение структуры их молекул, приводящее к потере их естественных свойств.

ДНК-фингерпринтирование, DNA fingerprinting, DNA fingerprint technique (от англ. *finger* – палец и *print* – печать, оттиск, отпечаток) –

метод создания генетических «отпечатков пальцев», основанный на анализе полиморфизма ДНК.

ДНК-полимераза – фермент, участвующий в репликации ДНК. Ферменты этого класса катализируют полимеризацию дезоксирибонуклеотидов вдоль цепочки нуклеотидов ДНК, которую фермент «читает» и использует в качестве шаблона. Тип нового нуклеотида определяется по принципу комплементарности с шаблоном, с которого ведется считывание. Собираемая молекула комплементарна шаблонной моноспирали и идентична второму компоненту двойной спирали. Выделяют ДНК-зависимую ДНК-полимеразу (КФ 2.7.7.7), использующую в качестве матрицы одну из цепей ДНК, и РНК-зависимую ДНК-полимеразу (другое название – обратная транскриптаза, КФ 2.7.7.49), способную также к считыванию информации с РНК (обратная транскрипция). ДНК-полимеразу считают холоферментом, поскольку для нормального функционирования она требует присутствия ионов магния в качестве кофактора. В отсутствие ионов магния о ней можно говорить как об апоферменте. ДНК-полимераза начинает репликацию ДНК, связываясь с отрезком цепи нуклеотидов. Среднее количество нуклеотидов, присоединяемое ДНК-полимеразой за один акт связывания/диссоциации с матрицей, называют процессивностью.

Гены «домашнего хозяйства» (англ. *housekeeping genes*) – это гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Гены домашнего хозяйства функционируют повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма. Основной функцией данных генов в организме является обеспечение процессов репликации (удвоения) ДНК, транскрипции, трансляции, анаболизма и катаболизма (гликолиз, цикл Кребса, глюконеогенез, расщепление белков, жиров и углеводов, биосинтез аминокислот и нуклеотидов и др.).

Зональный электрофорез – электрофорез, проводящийся при постоянном (неизменяющемся) значении pH буферного раствора, заполняющего данный носитель (бумагу, гель и др.). Исследуемый образец наносится пятном или тонким слоем на носитель, по которому и перемещается в электрическом поле.

Зонд генетический – короткий отрезок ДНК или РНК известной структуры или функции, меченный каким-либо радиоактивным или флуоресцентным соединением.

Изменчивость – вариабельность (разнообразие) признаков среди представителей данного вида.

Индуктор – фактор (вещество, свет, теплота), вызывающий транскрипцию генов, находящихся в неактивном состоянии.

Интеграза – фермент, осуществляющий внедрение какого-либо генетического элемента в геном через специфический сайт.

Интрон – некодирующий участок гена, который транскрибируется, а затем удаляется из предшественника мРНК при ее редактировании – сплайсинге.

Ионная сила раствора – мера интенсивности электрического поля, создаваемого ионами в растворе. Полусумма произведений из концентрации всех ионов в растворе на квадрат их заряда.

Кассета экспрессионная – фрагмент ДНК, содержащий все необходимые генетические элементы для экспрессии внедренного в него гена.

кДНК – одонитевая ДНК, синтезируемая *in vivo* по матрице РНК с помощью обратной транскриптазы.

Кодон – тройка расположенных подряд нуклеотидных остатков в ДНК или РНК, кодирующая определенную аминокислоту или являющаяся сигналом окончания трансляции.

Комплементарность (в генетике) – свойство азотистых оснований образовывать с помощью водородных связей парные комплексы аденин-тимин (или урацил) и гуанин-цитозин при взаимодействии цепей нуклеиновых кислот.

Контиг – в секвенировании группа из нескольких последовательно соединенных участков ДНК.

Лигаза – фермент, образующий фосфодиэфирную связь между двумя полинуклеотидами.

Лизис – распад клетки, вызванный разрушением ее оболочки.

Линкер – короткий синтетический олигонуклеотид, применяемый для соединения фрагментов ДНК *in vitro*; обычно содержит участок узнавания определенной рестриктазой.

Липкие концы – комплементарные одонитевые участки ДНК, расположенные на концах молекул ДНК.

Локус – участок ДНК (хромосомы), где расположена определенная генетическая детерминанта.

Маркерный ген – ген в рекомбинантной ДНК, кодирующий селективный признак.

Матричная рибонуклеиновая кислота (мРНК, синоним – информационная РНК, иРНК) – РНК, содержащая информацию о первичной структуре (аминокислотной последовательности) белков.

Метилазы, метилтрансферазы – ферменты, присоединяющие метильную группу ($-\text{CH}_3$) к определенным азотистым основаниям в ДНК, РНК и к определенным аминокислотным остаткам белков.

Микросателлиты (или простые короткие повторы) – варьирующие участки (локусы) в ядерной ДНК и ДНК органелл (митохондрий и пластид), состоящие из повторяющихся фрагментов длиной от 1 до 6 пар оснований.

Мобильные генетические элементы – последовательности ДНК, которые могут перемещаться внутри генома.

Молекулярная биология – комплекс биологических наук, изучающих механизмы хранения, передачи и реализации генетической информации, строение и функции нерегулярных биополимеров (белков и нуклеиновых кислот).

Молекулярная масса – сумма масс атомов, входящих в состав данной молекулы; выражается в атомных единицах массы (а. е. м.).

Мутация – стойкое (т. е. такое, которое может быть унаследовано потомками данной клетки или организма) преобразование генотипа, происходящее под влиянием внешней или внутренней среды.

Наследственность – способность организмов передавать свои признаки и особенности развития потомству.

Нуклеазы – большая группа ферментов, гидролизующих фосфодиэфирную связь между субъединицами нуклеиновых кислот. Различают несколько типов нуклеаз в зависимости от их специфичности: экзонуклеазы и эндонуклеазы, рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы (катализируют гидролиз связей между нуклеотидами только в ДНК), рестриктазы и некоторые другие.

Обратная транскриптаза (также известная как ревертаза или РНК-зависимая ДНК-полимераза) – фермент, катализирующий синтез ДНК на матрице РНК в процессе, называемом обратной транскрипцией. Называется так потому, что большинство процессов транскрипции в живых организмах происходит в другом направлении, а именно с молекулы ДНК синтезируется РНК-транскрипт.

Олигонуклеотид – короткий фрагмент ДНК или РНК, получаемый либо путем химического синтеза, либо расщеплением более длинных полинуклеотидов. Используются в качестве зондов или праймеров.

Оператор – это последовательность нуклеотидов ДНК, с которой связывается регуляторный белок-репрессор или активатор. Оператор находится между промотором и структурными генами. Он может быть связан с особым белком-репрессором, который не дает двигаться РНК-полимеразе по цепи ДНК и препятствует синтезу ферментов. Таким образом, гены могут включаться и выключаться в зависимости от наличия в клетке соответствующих белков-репрессоров.

Оперон – функциональная единица генома у прокариот, в состав которой входят цистроны (гены, единицы транскрипции), кодирующие совместно или последовательно работающие белки и объединенные под одним (или несколькими) промоторами. Опероны по количеству цистронов делят на моно-, олиго- и полицистронные, содержащие соответственно только один, несколько или много цистронов (генов). Характерными примерами оперонной организации генома прокариот являются лактозный оперон, триптофановый, пиримидиновый и *bgl* опероны у *Escherichia coli*. Начинается и заканчивается оперон регуляторными областями – промотором в начале и терминатором в конце, кроме этого каждый отдельный цистрон может иметь в своей структуре собственный промотор и/или терминатор.

Плазмиды – это двуцепочечные ДНК-молекулы, которые существуют в клетках независимо от генома и способные реплицироваться автономно. Иногда плазмиды могут встраиваться в состав генома клетки-хозяина. Плазмиды были найдены в клетках представителей всех трех ветвей живого мира: *Archea*, *Bacteria*, *Eukarya*.

Полилинкер – короткая искусственная нуклеотидная последовательность, содержащая несколько уникальных перекрывающихся сайтов узнавания для рестрикционных эндонуклеаз. Вводится в состав клонирующего вектора для встраивания в него чужеродных фрагментов ДНК.

Полимераза – фермент, главной биологической функцией которого является синтез полимеров нуклеиновых кислот. ДНК-полимераза и РНК-полимераза синтезируют молекулы ДНК и РНК соответственно, в основном путем комплементарного копирования родительских цепей ДНК или РНК.

Праймер – это короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК- или РНК-мишени, служит затравкой

для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы (при репликации ДНК). Затравка необходима ДНК-полимеразам для инициации синтеза новой цепи, с 3'-конца (гидроксильной группы) праймера. ДНК-полимераза последовательно добавляет к 3'-концу праймера нуклеотиды, комплементарные матричной цепи.

Промотор – в генетике это последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала специфической, или осмысленной, транскрипции. У прокариот промотор включает ряд мотивов, важных для узнавания его РНК-полимеразами. Промотор асимметричен, что позволяет РНК-полимеразе начать транскрипцию в правильном направлении и указывает на то, какая из двух цепей ДНК будет служить матрицей для синтеза РНК.

Процессинг РНК (посттранскрипционные модификации РНК) – совокупность процессов в клетках эукариот, которые приводят к превращению первичного транскрипта в зрелую РНК. В зависимости от типа РНК (матричные, рибосомные, транспортные, малые ядерные) их предшественники подвергаются разным последовательным модификациям. Например, предшественники матричных РНК подвергаются кэпированию, сплайсингу, полиаденилированию, метилированию и иногда редактированию. Процессинг – это процесс превращения транскрипта (пре-иРНК, полученной при транскрипции) в зрелую иРНК, пригодную для трансляции. Стадии процессинга: 1) кэпирование: к 5'-концу транскрипта присоединяется кэп (англ. «шапочка»), состоящая из модифицированного гуанина; 2) полиаденирование: к 3'-концу транскрипта присоединяется от 100 до 200 адениновых нуклеотидов; 3) сплайсинг – это процесс вырезания из транскрипта нужных участков и склеивания их между собой. У эукариот из транскрипта выбрасывается в среднем 5/6 длины.

Регулон – система генов, разбросанных по всему геному, но подчиняющихся общему регуляторному белку.

Рекомбинантная ДНК – ДНК, образованные объединением *in vitro* (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Ключевыми в этом определении являются слова «фрагмент ДНК» и «объединение *in vitro*», что указывает на сущность генетической инженерии и ее отличие от всех остальных методов получения гибридных (или химерных) организмов, таких как генетическая селекция, эмбриональная инженерия и т. д. Фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием ферментов рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми,

так и с липкими концами. Сшивка фрагментов ДНК производится тремя основными методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагменты сшиваемых ДНК. Рекомбинантная ДНК-молекула ДНК получена в результате объединения *in vitro* чужеродных (в природе никогда вместе не существующих) фрагментов ДНК с использованием методов генной инженерии.

Рекомбинация *in vitro* (*in vitro* recombination) (лат. *re-* – приставка, обозначающая повторность действия или противоположное действие и *combinatio* – соединение; лат. *in vitro* – в пробирке) – приемы, используемые в генной инженерии, заключающиеся в искусственных операциях *in vitro*, которые приводят к созданию новых рекомбинантных молекул ДНК.

Ренатурация – обратный переход молекулы биополимера, например, белка или нуклеиновой кислоты, из денатурированного (неактивного) состояния в нативное (биологически активное).

Репликон – молекула или участок ДНК или РНК, реплицирующийся из одной точки начала репликации.

Репрессор – регуляторный белок, подавляющий транскрипцию генов регулируемого им оперона в результате связывания с оператором.

Рестриктазы (от лат. *restrictio* – ограничение) – группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих реакцию гидролиза нуклеиновых кислот.

Рестрикционная карта – линейное изображение последовательности ДНК, которое показывает расположение сайтов узнавания специфических рестрикционных ферментов.

Рестрикционный анализ – установление мест расщепления одной или несколькими рестриктазами конкретной нуклеотидной последовательности ДНК.

Рибонуклеазы – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз фосфодиэфирных связей между нуклеозидами в РНК.

Водородный показатель, pH – мера активности (в очень разбавленных растворах она эквивалентна концентрации) ионов водорода в растворе, количественно выражающая его кислотность.

Сайт рестрикции (участок узнавания) – короткая последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, которая распознается ферментом эндонук-

леазой рестрикции-модификации (рестриктазой). Рестриктаза связывается с молекулой ДНК в точке расположения сайта рестрикции и перерезает цепочку нуклеотидов внутри сайта или в непосредственной близости от него.

Ферменты рестрикции выработаны бактериями в процессе эволюции с целью разрушения чужеродной ДНК, способной проникнуть внутрь клетки и вызвать ее трансформацию. Размер сайта рестрикции различных рестриктаз составляет, как правило, 4–6 нуклеотидов. Сайты рестрикции в ДНК самой бактерии замаскированы посредством метилирования остатков А и С.

Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот – ДНК и РНК) – определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности. В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Размеры секвенируемых участков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов (next-generation sequencing) и 1000 пар нуклеотидов при секвенировании по Сэнгеру.

Спейсер (ДНК-спейсер) — нетранскрибируемая последовательность ДНК между tandemно повторяющимися генами, как, например, в рРНК у эукариот.

Сплайсинг – процесс вырезания определенных нуклеотидных последовательностей из молекул РНК и соединения последовательностей, сохраняющихся в «зрелой» молекуле, в ходе процессинга РНК.

Тимин (5-метилурацил) – производное пиримидина, одно из пяти азотистых оснований. Присутствует во всех живых организмах, где вместе с дезоксирибозой входит в состав нуклеозида тимидина, который может фосфорилироваться 1–3 остатками фосфорной кислоты с образованием нуклеотидов тимидинмоно (ди-, три-) фосфорной кислоты (ТМФ, ТДФ и ТТФ). Дезоксирибонуклеотиды тимина входят в состав ДНК, в РНК на его месте располагается рибонуклеотид урацила. Тимин комплементарен аденину, образуя с ним 2 водородные связи.

Транскрипция – процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы, происходящий во всех живых клетках. Другими словами, это перенос генетической информации с ДНК на РНК.

Транскрипт – молекула РНК, образующаяся в результате транскрипции (экспрессии соответствующего гена или участка ДНК). Примерами транскриптов являются: мРНК, рРНК, тРНК, малые РНК.

Обратная транскриптаза (также известная как ревертаза или РНК-зависимая ДНК-полимераза) – фермент, катализирующий синтез ДНК на матрице РНК в процессе, называемом обратной транскрипцией.

Трансляция – процесс синтеза белка из аминокислот на матрице информационной (матричной) РНК (иРНК, мРНК), осуществляемый рибосомой.

Транспозоны – это участки ДНК организмов, способные к передвижению (транспозиции) и размножению в пределах генома. Транспозоны также известны под названием «прыгающие гены» и являются примерами мобильных генетических элементов.

Ультрафиолетовое излучение – электромагнитное излучение, занимающее спектральный диапазон между видимым и рентгеновским излучениями. Длины волн УФ-излучения лежат в интервале от 10 до 400 нм.

Цитозин – азотистое основание, производное пиримидина. С рибозой образует нуклеозид цитидин, входит в состав нуклеотидов ДНК и РНК. Во время репликации и транскрипции по принципу комплементарности образует три водородные связи с гуанином.

Экзон – участок гена (ДНК) эукариот, несущий генетическую информацию, кодирующую синтез продукта гена (белка). Соответствующие экзону участки ДНК, в отличие от интронов, полностью представлены в молекуле информационной РНК, кодирующей первичную структуру белка.

Экзонуклеазы – белки из группы нуклеаз, отщепляющие концевые мононуклеотиды от полинуклеотидной цепи путем гидролиза фосфодиэфирных связей между нуклеотидами.

Экспрессия генов – это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт – РНК или белок.

Электрофорез – это движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля.

Электрофореграмма – картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления.

Электрофоретическая подвижность (u) данной молекулы – это скорость движения заряженной молекулы (выражаемая в см/ч) в электрическом поле с напряженностью 1 В/см. Изoeлектрическая точка – такое

значение pH среды (обозначаемое как pI), при котором положительные и отрицательные заряды ионизированных групп скомпенсированы, поэтому заряд всей белковой молекулы равен нулю.

Эндонуклеазы – белки из группы нуклеаз, расщепляющие фосфодиэфирные связи в середине полинуклеотидной цепи.

УЧЕБНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

1. RealTime амплификатор многофункциональный CFX96 Touch, BioRad (США). Предназначен для проведения ПЦР в реальном времени. Позволяет проводить мультиплексный анализ до 5 мишеней в 96 пробах одновременно.

2. Амплификатор T100 1861096, BioRad (США). Прибор для проведения ПЦР. Функция температурного градиента. Нагреваемая крышка с автоматической регулировкой высоты. 96-луночный формат реакционного блока.

3. ПЦР-бокс BS UV-Cleanerbox BioSan (Латвия). Предназначен для организации изолированного от внешней среды пространства в ПЦР-лабораториях. Две УФ-лампы (15 Вт) дезинфицируют рабочий объем бокса в течение 15–30 мин. Боксы оснащены бактерицидными проточными рециркуляторами воздуха, обеспечивающими постоянное обеззараживание внутри бокса во время работы. Эффективность работы более 99 % за цикл.

4. Электрофорезная горизонтальная камера Sub-Cell Model 192, 25 × 25, 26 и 51 лунка, 1,5 мм, заливочный столик, Bio-Rad (США). Применяется для горизонтального электрофореза ДНК. Можно работать с гелями длиной до 25 см. При такой длине гелей возможно использовать 4 или более 51-луночных гребенок и одновременно анализировать образцы с двух 96-луночных планшетов. Имеются порты для рециркуляции буферов для Southern и Northern анализа. УФ-прозрачная подложка для геля снабжена флуоресцентной линейкой; гель можно заливать как непосредственно на подложке с использованием наклонных заслонок, так и с помощью заливочного столика; возможно использование подложек различной длины.

5. Электрофорезная горизонтальная камера Sub-Cell GT Cell, 15 × 20 см, 15 и 20 лунок, 1,5 мм, заливочный столик, Bio-Rad (США). Для разделения до 120 образцов. УФ-прозрачная подложка для геля снабжена флуоресцентной линейкой; гель можно заливать как непосредственно на подложке с использованием наклонных заслонок, так и с помощью заливочного столика; возможно использование подложек различной длины.

6. Источник питания PowerPac Basic 10–300 В, 4–400 мА. Предназначен для создания тока определенной силы и напряжения и подключения одной или нескольких камер для электрофореза фрагментов ДНК или белков, а также для подключения горизонтальной камеры Sub-Cell GT Cell.

7. Источник питания для электрофореза Power Pac Power Supply Universal 10–2500 мА, 10–500 В, 1–500 Вт. Проведение вертикального и горизонтального фореза, блоттинг. Предназначен для подключения горизонтальной камеры Sub-Cell Model 192.

8. Система гель-документирования GelDoc XR Plus BioRad 1708195. Используется для получения, сохранения и анализа изображения гелей. Области применения системы: детекция нуклеиновых кислот, вестерн-блоттинг, 2-D электрофорез, дот-блоттинг, денситометрия, подсчет числа колоний. Комплект поставки включает CCD-камеру, трансиллюминатор (УФ-свет и видимый свет), защитный колпак («темную комнату»), фильтр EtBR/SYBR Geen BP, защиту от УФ-излучения, источник питания, FireWire-карту для компьютера, комплект кабелей для коммутации и оригинальный софт Quantity One.

9. Центрифуга Eppendorf 5804 (в комплекте 4 ротора: для микропробирок, луночных планшетов, стрипов и пробирок). Предназначена для разделения жидкостей разных удельных плотностей и отделения жидкости от осадка. Может использоваться при выделении ДНК, на разных стадиях ДНК-анализа, при анализе белков. Максимальная скорость – до 14 тыс. об/мин (до 20 800 g); максимальная вместимость – 6×85 мл, 4×100 мл; тип емкостей – до 100 мл, планшеты, стрипы, предметные стекла; встроенный конденсатоотводчик; функция «FastTemp»; сохранение в памяти до 35 программ; 10 режимов разгона и торможения для защиты чувствительных образцов; автоматическое отключение при дисбалансе. Все роторы и аксессуары автоклавируются (121 °C, 20 мин).

10. Центрифуга MiniSpin Plus с дополнительным ротором для стрипов. Предназначена для разделения жидкостей разных удельных плотностей и отделения жидкости от осадка. Используется при небольших объемах работы. Для микропробирок $12 \times 1,5/2,0$ мл, «Эппендорф». Вместимость – $12 \times 1,5/2,0$ мл; максимальное ускорение – до 14 тыс. об/мин (до $14\,100\text{ g}$).

11. Микроцентрифуга вортекс «Микроспин» FV-2400, BioSan (Латвия). Предназначена для перемешивания образцов, реактивов и праймеров. FV-2400 является центрифугой «открытого типа» (без крышки), что

повышает скорость проведения операций центрифугирования и ресуспендирования. Обеспечивает возможность одновременного перемешивания и разделения образцов за счет модулей центрифугирования и перемешивания, выполненных единым блоком. Постоянная скорость вращения – 2400 об/мин. Два режима работы – непрерывный и импульсный. Формат роторов – 0,2/0,5/1,5 мл.

12. Твердотельный термостат «Термит» (Россия). Термостат «Термит» представляет собой твердотельный термостат для научных и клинико-диагностических исследований, рассчитанный на использование пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и 0,5 мл. Необходим для процедур, связанных с нагревом образцов, например, при выделении ДНК. Технические характеристики: число пробирок «Эппендорф» объемом 1,5 мл – 40 шт., 0,5 мл – 28 шт.; диапазон рабочих температур – от окружающей до 99 °С; отсчет времени – от 1 до 99 мин; точность поддержания температуры $\pm 1,0$ °С; дискретность задания температуры – 1,0 °С.

13. Весы ОНАУS AV 264 C (260 г, цена деления – 0,1 мг, ветрозащита, автокалибровка). Аналитические весы, используемые для точного взвешивания небольших количеств образцов или химических веществ.

14. Весы ОНАУS портативные SPS 202F (цена деления – 200 г, 0,01 г). Относятся к простым весам. Модели до 600 г комплектуются калибровочной гирей. 6 моделей с НПВ от 210 до 6000 г и дискретностью от 0,01 до 1 г.

15. Морозильник LGUex 1500, –26 °С, вертикальный, 139 л, Liebherr (Австрия). Предназначен для хранения образцов ДНК, праймеров, реактивов, ферментов. Температурный диапазон – от –9 °С до –26 °С.

Учебное издание

Кутлунина Наталья Анатольевна
Ермошин Александр Анатольевич

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие

Заведующий редакцией *М. А. Овечкина*
Редактор *Н. В. Чапаева*
Корректор *Н. В. Чапаева*
Компьютерная верстка *Г. Б. Головина*

Подписано в печать 20.09.17. Формат 60×84/16.
Бумага офсетная. Цифровая печать.
Уч.-изд. л. 7,5. Усл. печ. л. 8,37. Тираж 50 экз. Заказ 131.

Издательство Уральского университета
Редакционно-издательский отдел ИПЦ УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4
Тел.: +7 (343) 389-94-79, 350-43-28
E-mail: rio.marina.ovechkina@mail.ru

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4
Тел.: +7 (343) 358-93-06, 350-58-20, 350-90-13
Факс: +7 (343) 358-93-06
<http://print.urfu.ru>

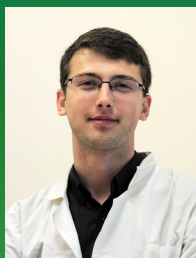
Для заметок

Для заметок



Кутлунина Наталья Анатольевна

Кандидат биологических наук, доцент департамента биологии и фундаментальной медицины Уральского федерального университета. Ведет общие и специальные курсы ботанического направления, а также курсы «Молекулярно-генетические методы исследования биологических систем» и «Популяционная генетика». Проходила стажировку по генетике с основами селекции, медицинской генетике и эволюции в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Автор около 100 научных работ. Сфера научных интересов – генетическая структура популяций цветковых растений с разными типами размножения.



Ермошин Александр Анатольевич

Кандидат биологических наук, доцент кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Уральского федерального университета. Окончил магистратуру и аспирантуру УрФУ, стажировался в Ягеллонском университете (Краков, Польша) и Университете им. Г. Менделя (Брно, Чехия). Автор более 40 научных работ. Победитель областного конкурса «Преподаватель года» по направлению «Естественные науки» (2015). Сфера научных интересов – биохимия, биотехнология и геновая инженерия растений.